



วิทยานิพนธ์

การพัฒนาเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์สำหรับกล้วยไม้สกุลแวนด้า

**DEVELOPMENT OF MICROSATELLITE MARKERS FOR
VANDA ORCHID**

นางสาวปรารถนา เพื่อกวีไล

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

พ.ศ. 2550



ใบรับรองวิทยานิพนธ์
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (พันธุศาสตร์)
ปริญญา

พันธุศาสตร์

สาขา

พันธุศาสตร์

ภาควิชา

เรื่อง การพัฒนาเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์สำหรับกล้วยไม้สกุลแวนด้า

Development of Microsatellite Markers for *Vanda* Orchid

นามผู้วิจัย นางสาวปรารถนา เพือกวิไล

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

ประธานกรรมการ (รองศาสตราจารย์สุรินทร์ ปิยะโชคนากุล, Dr.Agr.)

กรรมการ (ศาสตราจารย์ประดิษฐ์ พงศ์ทองคำ, วท.ม.)

กรรมการ (รองศาสตราจารย์ปณิธิกร หะรินสุต, Dr.Agr.Sci.)

หัวหน้าภาควิชา (ผู้ช่วยศาสตราจารย์เลิศลักษณ์ เงินศิริ, Ph.D.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์วินัย อากงหาญ, M.A.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ 28 เดือน พฤศจิกายน พ.ศ. 2550

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การพัฒนาเครื่องหมายไมโครแซเทลไลท์สำหรับกล้วยไม้สกุลแวนด้า

Development of Microsatellite Markers for *Vanda* Orchid

โดย

นางสาวปรารถนา เพือกวิไล

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (พันธุศาสตร์)

พ.ศ. 2550

ปรารภณา เพื่อกวีไล 2550: การพัฒนาเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์สำหรับกล้วยไม้
สกุลแวนด้า ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (พันธุศาสตร์) สาขาพันธุศาสตร์ ภาควิชา
พันธุศาสตร์ ปรธานกรรมการที่ปรึกษา: รองศาสตราจารย์สุรินทร์ ปิยะโชคนากุล,
Dr. Agr. 67 หน้า

วัตถุประสงค์ของการศึกษาค้นคว้าครั้งนี้ คือ การพัฒนาเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ที่
จำเพาะในกล้วยไม้สกุลแวนด้า โดยการสร้างห้องสมุดจีโนมแบบ microsatellite enrichment โดย
ใช้โพรบแบบ dinucleotide repeat คือ $(CA)_{15}$ และ $(GA)_{15}$ และโพรบแบบ trinucleotide repeat
 $(ACC)_{10}$ และ $(CCT)_{10}$ ร่วมกับการคัดเลือกโคลนที่ให้ผลบวกด้วยเทคนิค dot blot hybridization
จากการตรวจสอบพบว่า ห้องสมุดจีโนมที่ใช้โพรบแบบ dinucleotide และ trinucleotide repeat ได้
โคลนที่ให้ผลบวก 82.45 และ 9.91 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เมื่อนำโคลนไปหาลำดับเบส พบว่ามี
ลำดับไมโครแซทเทลไลท์ 83.12 เปอร์เซ็นต์ โดยส่วนใหญ่เป็นลำดับไมโครแซทเทลไลท์แบบ
compound repeat ชนิด $(GA)_n(GT)_n$ คิดเป็น 45.19 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาเป็นลำดับไมโครแซทเทล
ไลท์แบบ $(GA)_n$, $(CA)_n$ และ $(CCT)_n$ คิดเป็น 22.59, 15.93 และ 9.29 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ
สามารถออกแบบไพรเมอร์ได้ทั้งหมด 56 คู่ พบว่ามีไพรเมอร์ 9 คู่ ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ
ได้ตามที่คาดหวัง และให้ความแตกต่างของขนาดดีเอ็นเอในตัวอย่างต่างๆ โดยมีจำนวนแอสลิต
3-9 แอสลิตต่อตำแหน่ง และมีค่า expected heterozygosity (H_e) ระหว่าง 0.315-0.7438 และเมื่อ
พิจารณาจากการตรวจสอบดีเอ็นเอของกล้วยไม้ โดยใช้ไพรเมอร์ทั้ง 9 คู่ พบว่าโอกาสที่ 2 ตัวอย่าง
จะมีจีโนไทป์เหมือนกันทั้ง 9 ตำแหน่ง (probability of identity, PI) อยู่ที่ประมาณ 1 ใน 1,000,000
ดังนั้นเครื่องหมายดีเอ็นเอนี้ น่าจะมีประสิทธิภาพในการใช้จำแนกพันธุ์กล้วยไม้ได้ เมื่อนำผลมา
วิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้ทั้ง 33 ตัวอย่าง พบว่าสามารถจำแนกกล้วยไม้
แวนด้าไปกลุ่ม ออกจากกล้วยไม้แวนด้าไปแบบได้อย่างชัดเจน

Prattana Phuekvilai 2007: Development of Microsatellite Markers for *Vanda* Orchid.

Master of Science (Genetics), Major Field: Genetics, Department of Genetics.

Thesis Advisor: Associate Professor Surin Peyachoknagul, Dr.Agr. 67 pages.

The aim of this research was to develop microsatellite markers for *Vanda* orchid from the enriched library using dinucleotide repeat [(CA)₁₅ and (GA)₁₅] and trinucleotide repeat [(ACC)₁₀ and (CCT)₁₀] as probes. Positive clones were selected by dot blot hybridization. The results showed that 82.45% and 9.91% of dinucleotide and trinucleotide enriched libraries were positive signals. After sequencing 83.12% of the positive clones contained microsatellite sequences. The four most abundant sequences were the compound repeat of (GA)_n(GT)_n (45.19%), (GA)_n (22.59%), (CA)_n (15.93%) and (CCT)_n (9.26%). Fifty six pairs of primers were designed and nine primers pairs could amplify the DNA giving the expected PCR product with polymorphism among samples. The alleles number ranged from 3 to 9 alleles per locus and expected heterozygosity (H_e) were between 0.3150 and 0.7438. Considering 9 loci of these microsatellite markers, the probability of identity (PI) of any 2 samples having the same genotype was approximately 1 in 1,000,000. Therefore, these markers could be used for identification of the orchid varieties. Genetic relationship of 33 *Vanda* orchids was analyzed and the result showed that *Vanda teres* and *Vanda* Miss Joaquim were clustered out from other *Vanda* orchids.

Prattana Phuekvilai

Student's signature

Surin Peyachoknagul

Thesis Advisor's signature

22 / Nov / 2007

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. สุรินทร์ ปิยะโชคนากุล ประธานกรรมการ ที่ช่วยเหลือในการวางแผนงานวิจัย ตลอดจนให้คำปรึกษาแนะนำตลอดช่วงเวลาที่ทำงานวิจัย รวมถึงตรวจทานแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆในวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์จิตราพรรณ พิสิฐ ที่ช่วยจัดหาตัวอย่างกล้วยไม้พันธุ์ต่างๆ ในการวิจัย และศาสตราจารย์ประดิษฐ์ พงศ์ทองคำ รองศาสตราจารย์ ดร. ปุณทริกา หะริณสุต กรรมการ และ ดร. เกียรติวิ ชูวงศ์โกมล ผู้แทนบัณฑิตวิทยาลัย ที่กรุณาให้คำแนะนำ และช่วยเหลือในการแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้มีความสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณ คณาจารย์ภาควิชาพันธุศาสตร์ทุกท่าน ที่กรุณาอบรมสั่งสอนถ่ายทอดวิชาความรู้ และให้กำลังใจเป็นอย่างดีเสมอมา

ขอบขอบคุณ เจ้าหน้าที่ทุกท่าน พี่ๆ และน้องๆ ในภาควิชาพันธุศาสตร์ ที่ให้คำปรึกษาแนะนำ และเป็นกำลังใจในการทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้

ท้ายที่สุดนี้ ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ และสมาชิกทุกคนในครอบครัว ที่คอยดูแล เป็นกำลังใจ และสนับสนุนกำลังใจทรัพย์ ตลอดจนคอยช่วยเหลือในทุกสิ่งจนสำเร็จการศึกษา

ปรารธนา เพื่อภวิไล

พฤษภาคม 2550

สารบัญ

หน้า

สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(3)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	3
การตรวจเอกสาร	4
อุปกรณ์และวิธีการ	17
อุปกรณ์	17
วิธีการ	18
ผลและวิจารณ์	22
สรุป	42
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	44
ภาคผนวก	55
ประวัติการศึกษา และการทำงาน	67

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	จำนวนโคลนที่ได้จากการพัฒนาเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ชั้นต่างๆ จากห้องสมุดจีโนมที่ใช้โพรบแบบ dinucleotide และ trinucleotide repeat	23
2	จำนวนลำดับเบสแต่ละประเภทที่พบในการพัฒนาเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์จากห้องสมุดจีโนมที่ใช้โพรบแบบ dinucleotide และ trinucleotide repeat	24
3	ลำดับเบสแบบไมโครแซทเทลไลต์ชนิดต่างๆ ที่พบในการพัฒนาเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์	25
4	ลำดับเบสของไพรเมอร์ ชนิดของลำดับเบสซ้ำที่อยู่ในระหว่างคู่ไพรเมอร์ และค่า T_m ของไพรเมอร์ทั้ง 9 คู่	27
5	จีโนไทป์ของกล้วยไม้ทั้ง 33 ตัวอย่างจากการตรวจสอบโดยใช้ไพรเมอร์ 9 คู่	32
6	จำนวนแอลลีล ขนาดผลผลิตพีซีอาร์ ค่า observed heterozygosity (H_o), expected heterozygosity (H_e), effective number of allele (n_e) และค่า probability of identity (PI) ของไพรเมอร์ทั้ง 9 คู่	35
7	ค่า similarity index ที่ได้จากการเปรียบเทียบความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม ระหว่างกล้วยไม้ 33 ตัวอย่าง	39

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	ผลการตรวจสอบดีเอ็นเอของกล้วยไม้ด้วยชุดไพรเมอร์ C32 พบแถบดีเอ็นเอ ขนาดประมาณ 193-204 คู่เบส จำนวน 3 แอลลีล (M คือ แถบดีเอ็นเอมาตรฐาน 1-28 คือ ตัวอย่างกล้วยไม้สกุลแวนด้าตัวอย่างที่ 1-28 ตามหน้าที่ 17)	28
2	ผลการตรวจสอบดีเอ็นเอของกล้วยไม้ด้วยชุดไพรเมอร์ C106 พบแถบดีเอ็นเอ ขนาดประมาณ 193-205 คู่เบส จำนวน 4 แอลลีล (M คือ แถบดีเอ็นเอมาตรฐาน 1-28 คือ ตัวอย่างกล้วยไม้สกุลแวนด้าตัวอย่างที่ 1-28 ตามหน้าที่ 17)	29
3	ผลการตรวจสอบดีเอ็นเอของกล้วยไม้ด้วยชุดไพรเมอร์ C208 พบแถบดีเอ็นเอ ขนาดประมาณ 153-190 คู่เบส จำนวน 8 แอลลีล (M คือ แถบดีเอ็นเอมาตรฐาน 1-28 คือ ตัวอย่างกล้วยไม้สกุลแวนด้าตัวอย่างที่ 1-28 ตามหน้าที่ 17)	29
4	ผลการตรวจสอบดีเอ็นเอของกล้วยไม้ด้วยชุดไพรเมอร์ C225 พบแถบดีเอ็นเอ ขนาดประมาณ 206-263 คู่เบส จำนวน 9 แอลลีล (M คือ แถบดีเอ็นเอมาตรฐาน 1-28 คือ ตัวอย่างกล้วยไม้สกุลแวนด้าตัวอย่างที่ 1-28 ตามหน้าที่ 17)	29
5	ผลการตรวจสอบดีเอ็นเอของกล้วยไม้ด้วยชุดไพรเมอร์ C268 พบแถบดีเอ็นเอ ขนาดประมาณ 187-212 คู่เบส จำนวน 5 แอลลีล (M คือ แถบดีเอ็นเอมาตรฐาน 1-28 คือ ตัวอย่างกล้วยไม้สกุลแวนด้าตัวอย่างที่ 1-28 ตามหน้าที่ 17)	30
6	ผลการตรวจสอบดีเอ็นเอของกล้วยไม้ด้วยชุดไพรเมอร์ C359 พบแถบดีเอ็นเอ ขนาดประมาณ 152-167 คู่เบส จำนวน 6 แอลลีล (M คือ แถบดีเอ็นเอมาตรฐาน 1-28 คือ ตัวอย่างกล้วยไม้สกุลแวนด้าตัวอย่างที่ 1-28 ตามหน้าที่ 17)	30
7	ผลการตรวจสอบดีเอ็นเอของกล้วยไม้ด้วยชุดไพรเมอร์ C364 พบแถบดีเอ็นเอ ขนาดประมาณ 296-316 คู่เบส จำนวน 6 แอลลีล (M คือ แถบดีเอ็นเอมาตรฐาน 1-28 คือ ตัวอย่างกล้วยไม้สกุลแวนด้าตัวอย่างที่ 1-28 ตามหน้าที่ 17)	30
8	ผลการตรวจสอบดีเอ็นเอของกล้วยไม้ด้วยชุดไพรเมอร์ MOK26 พบแถบดีเอ็นเอ ขนาดประมาณ 212-272 คู่เบส จำนวน 8 แอลลีล (M คือ แถบดีเอ็นเอมาตรฐาน 1-28 คือ ตัวอย่างกล้วยไม้สกุลแวนด้าตัวอย่างที่ 1-28 ตามหน้าที่ 17)	31

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
9	ผลการตรวจสอบดีเอ็นเอของกล้วยไม้ด้วยคู่ไพรเมอร์ MOK29 พบแถบดีเอ็นเอ ขนาดประมาณ 155-175 คู่เบส จำนวน 5 แอลลีล (M คือ แถบดีเอ็นเอมาตรฐาน 1-28 คือ ตัวอย่างกล้วยไม้สกุลแวนด้าตัวอย่างที่ 1-28 ตามหน้าที่ 17)	31
10	ผลการตรวจสอบดีเอ็นเอของกล้วยไม้ด้วยคู่ไพรเมอร์ C202 พบแถบดีเอ็นเอ ขนาดประมาณ 149-155 คู่เบส จำนวน 2 แอลลีล (M คือ แถบดีเอ็นเอมาตรฐาน 1-28 คือ ตัวอย่างกล้วยไม้สกุลแวนด้าตัวอย่างที่ 1-28 ตามหน้าที่ 17)	31
11	ผลการตรวจพันธุ์พ่อแม่และลูกผสม ด้วยไพรเมอร์ C32 (ก) C106 (ข) C208 (ค) C225 (ง) C268 (จ) C359 (ฉ) C364 (ช) MOK26 (ซ) และ MOK29 (ฌ) (M คือ แถบดีเอ็นเอมาตรฐาน C คือ <i>Vanda Robert's Delight</i> เป็น control 29 คือ <i>Vanda Doctor Anek</i> 30 คือ <i>Aranda Christine</i> 31 คือ <i>Aranda Woleco</i> 32 คือ <i>Vanda sanderiana</i> 33 คือ <i>Vanda Doctor Anek</i> x <i>Vanda sanderiana</i>)	36
12	ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของตัวอย่างกล้วยไม้ทั้ง 33 ตัวอย่าง จากการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม NTSYS-pc version 2.1m	41

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

AFLP	=	amplified fragment length polymorphism
H_e	=	expected heterozygosity
H_o	=	observed heterozygosity
ISSR	=	inter simple sequence repeat
n_e	=	effective number of allele
PCR	=	polymerase chain reaction
PI	=	probability of identity
RAPD	=	random amplified polymorphic DNA
RFLP	=	restriction fragment length polymorphism
SRAP	=	sequence-related amplified polymorphism
SSR	=	simple sequence repeat
STR	=	short tandem repeat
T_a	=	annealing temperature
T_m	=	melting temperature

การพัฒนาเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์สำหรับกล้วยไม้สกุลแวนด้า

Development of Microsatellite Markers for *Vanda* Orchid

คำนำ

กล้วยไม้ เป็นไม้ตัดดอกที่สำคัญทางเศรษฐกิจของไทย มีแหล่งกำเนิดอยู่ในเขตร้อน มีประมาณ 796 สกุล 18,000 ชนิด สำหรับแวนด้าเป็นกล้วยไม้สกุลหนึ่ง ที่ได้รับความนิยมสูงเนื่องจากมีดอกสวยงาม ขนาดใหญ่ สีสด ดอกบานทน ช่อยาว และรูปทรงสวยได้สัดส่วน (ไชยา, 2534) ในปัจจุบันประเทศไทยได้รับการยอมรับว่าเป็นแหล่งผลิตต้นพันธุ์และดอกกล้วยไม้เมืองร้อนที่สำคัญที่สุดของโลก นอกจากนี้กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ กำหนดให้กล้วยไม้เป็นหนึ่งในสี่ของพืชในกลุ่ม Product champion ของประเทศ ซึ่งในปี 2549 มีปริมาณการส่งออกสูงถึง 23,334 ตัน และทำรายได้จากการส่งออก 2,581.01 ล้านบาท โดยปริมาณการส่งออกมีแนวโน้มเพิ่มขึ้น (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2550) ซึ่งมูลค่าจากการส่งออกกว่าครึ่ง ได้มาจากตลาดในประเทศญี่ปุ่น ซึ่งเป็นตลาดที่มีความต้องการสินค้าที่มีคุณภาพและมีมาตรฐานสูง (จุลภาค และคณะ, 2548)

การพัฒนางานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับมาตรฐานพันธุ์กล้วยไม้สกุลแวนด้า ซึ่งเป็นกล้วยไม้ที่เป็นที่นิยมในปัจจุบัน จึงนับว่ามีความสำคัญต่ออุตสาหกรรมกล้วยไม้เป็นอย่างมาก

เทคนิคการตรวจสอบโดยเครื่องหมายดีเอ็นเอมีหลายวิธี เช่น RAPD (Random amplified polymorphic DNA) (William *et al.*, 1990) AFLP (Amplified fragment length polymorphism) (Vos *et al.*, 1995) SRAP (Sequence-related amplified polymorphism) (Li and Quiros, 2001) ซึ่งเป็นวิธีตรวจสอบแบบสุ่มโดยการตรวจสอบดีเอ็นเอได้ครั้งละหลายตำแหน่ง ใช้วิธีการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยพีซีอาร์ แบบประยุกต์ หรือเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ (microsatellite marker) หรือ simple sequence repeat (SSR marker) ซึ่งใช้วิธีพีซีอาร์ แบบที่มีไพรเมอร์จำเพาะและเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในตำแหน่งที่แน่นอน นิยมใช้ในการตรวจสอบสิ่งมีชีวิตที่มีพันธุกรรมต่างกันไม่มากเนื่องจากการตรวจสอบดีเอ็นเอด้วยเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ มีความแม่นยำสูง สามารถบ่งบอกสภาพพันธุกรรมแบบโฮโมไซโกต และเฮเทอโรไซโกตได้ ทำซ้ำได้ผลดี จึงสามารถส่งข้อมูลแลกเปลี่ยนระหว่างแต่ละห้องปฏิบัติการได้ เหมาะสำหรับการตรวจสอบเพื่อจดทะเบียนและรับรองพันธุ์ หรือใช้ศึกษาโครงสร้างของประชากร เป็นต้น ในพืชมีการพัฒนาเครื่องหมายไมโคร

แซทเทลไลท์ เพื่อใช้ตรวจสอบหลายชนิด เช่น พืชตระกูลถั่ว (Hüttel *et al.*, 1999; He *et al.*, 2003) วัชพืชบางชนิด (Juillet *et al.*, 2003) *Arabidopsis* และ *Arabis* (Clauss *et al.*, 2002) ถั่วฝักยาว *Ophyrus* (Soliva *et al.*, 2000) เป็นต้น โดยการพัฒนาเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ในปัจจุบันใช้วิธี enrichment เพื่อเพิ่มโอกาสที่จะตรวจพบลำดับเบสที่เป็นไมโครแซทเทลไลท์มากขึ้น (Cordeiro *et al.*, 1999; Rivera *et al.*, 2003) ทำให้การพัฒนาเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ทำได้ง่ายและรวดเร็วขึ้น

ถั่วฝักยาวสกุลแวนด้าเป็นไม้ประดับที่มีผู้นิยมมาก มีการพัฒนาพันธุ์ขึ้นมาใหม่อย่างต่อเนื่อง ทั้งจากหน่วยงานภาครัฐและเอกชน รวมทั้งมีการนำพันธุ์ป่าดั้งเดิมมาขยายพันธุ์ทางการค้า หรือทำเป็นพ่อแม่พันธุ์ การตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาเพียงอย่างเดียวอาจไม่เพียงพอต่อการระบุสายพันธุ์ และยังคงรอจนต้นเจริญเต็มที่ด้วย การตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอสามารถทำได้ตั้งแต่พืชยังมีขนาดเล็กและได้ผลแน่นอน มีการนำมาใช้ตรวจสอบสิ่งมีชีวิตหลายชนิดและยอมรับกันอย่างกว้างขวาง

วิทยานิพนธ์นี้ เป็นการพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดไมโครแซทเทลไลท์ของถั่วฝักยาวสกุลแวนด้า โดยวิธี enrichment และนำเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ดังกล่าวมาใช้ในการจำแนกถั่วฝักยาวสกุลแวนด้าชนิดต่างๆ ด้วยเทคนิคพีซีอาร์เพื่อให้การระบุพันธุ์แม่นยำยิ่งขึ้น

วัตถุประสงค์

เพื่อพัฒนาเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์สำหรับกล้วยไม้สกุลแวนด้า และนำเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ดังกล่าว มาใช้ในการจำแนกกล้วยไม้สกุลแวนด้าชนิดต่างๆ ด้วยเทคนิคพีซีอาร์

การตรวจเอกสาร

1. ข้อมูลทั่วไปของกล้วยไม้

กล้วยไม้เป็นพืชใบเลี้ยงเดี่ยว (Subclass Monocotyledoneae) อยู่ในวงศ์กล้วยไม้ (Family Orchidaceae) ซึ่งนับเป็นวงศ์ที่ใหญ่ที่สุดวงศ์หนึ่งของพืชมีดอก (Class angiosperm) กล้วยไม้เป็นพืชที่มีวิวัฒนาการและการปรับตัวอย่างสูงในหลายรูปแบบ จึงสามารถกระจายพันธุ์อยู่ได้ในทุกภูมิภาคของโลก รูปแบบการเจริญเติบโตของกล้วยไม้มีหลายแบบ จากการสำรวจพบกล้วยไม้ที่ขึ้นบนต้นไม้ (epiphyte) 73% ที่เหลือพบขึ้นตามพื้นป่า (terrestrial) เช่น พื้นดิน พื้นหิน และที่ชื้นและความแตกต่างของชนิดกล้วยไม้จะพบมากในเขตร้อน (tropic) และมักจะเป็นกล้วยไม้อากาศ (epiphyte) ส่วนกล้วยไม้ที่อยู่ในเขตอบอุ่น (temperate) มักเป็นพวกกล้วยไม้ดิน (terrestrial) (กรรชิต, 2547) คาดว่าในโลก มีกล้วยไม้ประมาณ 17,000-35,000 ชนิด ปัจจุบันสำรวจและจำแนกได้ 796 สกุล ประมาณ 19,500 ชนิด (Dressler, 1993) สำหรับในประเทศไทยมีจำนวน 178 สกุล รวม 1,128 ชนิด (วีรัชย์, 2548)

เนื่องจากกล้วยไม้มีจำนวนชนิดมากมาย ดังนั้นจึงมีลักษณะต้นหลากหลาย ทั้งลักษณะการเจริญเติบโต รูปร่างของต้น ซึ่งอาจมีลักษณะเป็นหัว (tuber) อยู่ใต้ดิน เป็นเหง้า (rhizome) อยู่เหนือพื้นดิน หรือเป็นเหง้าเจริญอยู่บนต้นไม้ (ปฐพีชล, 2547) ความสูงของต้น พบตั้งแต่ 1 นิ้ว และให้ดอกมีขนาดเท่าหัวเข็มหมุด ไปจนถึงต้นสูง 3 เมตร หรือมีลำเป็นเถายาว มากกว่า 20 เมตร และให้ช่อดอกยาวถึง 15 ฟุต (Shuttleworth *et al.*, 1970)

2. ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของกล้วยไม้สกุลแวนด้า

กล้วยไม้สกุลแวนด้า จัดอยู่ใน Subfamily Epidendroideae และ Tribe Vandeae มีการกระจายพันธุ์อยู่ในทวีปเอเชีย ตั้งแต่อินเดีย ศรีลังกา พม่า ไทย อินโดนีเซีย จนถึงฟิลิปปินส์ โดยพบในป่าธรรมชาติประมาณ 40 ชนิด (มาลินี, 2542) ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของกล้วยไม้สกุลแวนด้า มีดังนี้

ราก เป็นรากอากาศ ที่ผิวนอกของราก มี multiple epidermis หรือ velamen ซึ่งมีลักษณะคล้ายฟองน้ำ หุ้มตลอดความยาวราก ทำหน้าที่อุ้มน้ำเก็บไว้ เพื่อป้องกันการขาดน้ำ ป้องกันเนื้อเยื่อ

ภายในได้รับบาดเจ็บ และช่วยยึดเกาะติดกับต้นไม้ นอกจากนี้รากกล้วยไม้ ยังมีคลอโรฟิลล์ จึงสามารถสังเคราะห์แสงได้ (ครรรชิต, 2547)

ลำต้น มีลักษณะการเจริญเติบโตเป็นแบบโมนอโพเดียล (monopodial) คือ มีการเจริญเติบโตไปทางยอดสูงขึ้นเรื่อยๆ โดยไม่มีการแตกกอ (ระพี, 2530)

แผ่นใบ (Leaf blade) มีการเรียงตัวของเส้นใบเป็นแบบขนาน ส่วนรูปแบบการเรียงตัวของใบจะซ้อนสลับกัน โดยใบอ่อนในขณะที่มีสภาพเป็นตา (vernation) จะเรียงซ้อนกัน เรียกว่า duplicate (ระพี, 2530) ใบของกล้วยไม้สกุลแวนด้า มีรูปร่างลักษณะที่แตกต่างกัน 3 แบบ จึงมีการจำแนกประเภทของแวนด้าออกเป็น 3 ประเภทตามลักษณะของใบ (สำอากค์, 2548) ดังนี้

1. แวนด้าใบกลม มีใบกลมยาวทรงกระบอก ค่อนข้างห่อหุ้ม โดยสังเกตได้จากการที่ใบอยู่ห่างกัน
2. แวนด้าใบแบน มีใบแผ่แบนออก ถ้าใช้มีดตัดตามขวางของใบ จะเห็นเป็นรูปตัววี (V) มีข้อถี่ ปล้องสั้น จะเห็นใบซ้อนชิดกัน ปลายใบมักจะโค้งลง และมีจักเป็นแฉก
3. แวนด้าใบร่อง เกิดจากการผสมระหว่างแวนด้าใบกลมกับแวนด้าใบแบน ลักษณะของลำต้นเตี้ยกว่าแวนด้าใบกลม ใบมีรูปทรงกระบอก แต่มันสันของใบจะเป็นร่องยาวตลอดใบ แวนด้าประเภทนี้จะไม่พบในป่าธรรมชาติ

กาบใบ (Leaf sheath) เป็นส่วนที่มีลักษณะเป็นแผ่นบาง ต่อลงไปจากโคนใบ ทำหน้าที่คล้ายกับก้านใบ โดยเชื่อมโยงระหว่างโคนของแผ่นใบกับลำต้นบริเวณข้อ และกาบใบจะโอบรอบลำต้นตรงส่วนปล้อง ซึ่งอยู่เหนือจากข้อที่โคนกาบใบนั้นติดอยู่ (ระพี, 2530)

ช่อดอก (Inflorescence) มีลักษณะก้านยาว โดยไม่แตกแขนง มีชื่อทางวิชาการว่า เรซิม (raceme) คือ ดอกที่โคนช่อจะบานก่อน และบานเรียงไล่ขึ้นไปยังดอกที่อ่อนกว่าตามลำดับ (ปฐพีชล, 2547) ช่อดอกหนึ่งๆ มีหลายดอก ช่อมีลักษณะตั้งตรง และแข็ง ส่วนที่อยู่ใต้ดอกล่างสุดลงมาถึงโคนช่อดอก เรียกว่า ก้านช่อดอก (scape หรือ peduncle) ส่วนที่เหนือขึ้นไปจากดอกล่างสุด ถึงยอดของช่อดอก เรียกว่า แกนช่อดอก (rachis) ดอกแต่ละดอก มีก้านดอก เรียกว่า ก้านดอกย่อย (pedicel) บริเวณโคนก้านดอกจะพบกาบรองดอก (bract) อยู่เสมอ ช่อดอกเกิดจากตาที่อยู่เหนือข้อ ทางด้านข้างลำต้น โดยจะเจริญแทงผ่านกาบใบออกมา (ระพี, 2530)

ดอก มีโครงสร้างประกอบด้วยกลีบชั้นนอก (sepal) 3 กลีบ กลีบชั้นใน (petal) 3 กลีบ กลีบชั้นนอกนั้น จะอยู่ข้างบนหนึ่งกลีบ และข้างล่าง 2 กลีบ กลีบชั้นใน จะมีกลีบหนึ่งอยู่ข้างล่าง อีก 2 กลีบอยู่ข้างบน (มาลินี, 2542) ทั้งกลีบชั้นนอกและกลีบชั้นในมีรูปร่างคล้ายคลึงกัน แต่กลีบชั้นในด้านล่างจะเปลี่ยนไป มีลักษณะเป็นเดือยแหลม ยื่นออกมา เรียกว่า ปาก หรือ กระเป๋ ปากของแวนด้าจะแบนเป็นแผ่นแข็ง และพุ่งออกด้านหน้า รูปร่างคล้ายช้อน โดยมีหุกระเป๋ แข็งและตั้งขึ้นทั้งสองข้าง (ไชยา, 2534) ส่วนเกสรเพศผู้และเกสรเพศเมีย จะรวมกันอยู่ในส่วนกลางของดอก เรียกว่า เส้าเกสร (column) ซึ่งจะยื่นออกมาที่จุดเดียวกันกับที่โคนกลีบดอก ปลายสุดของเส้าเกสรจะมีเรณู (pollen) โดยแวนด้าจะมีเกสรเพศผู้ 1 ชุด อับเรณูส่วนบน จะแยกออกเป็นฝาปิด (operculum) และร่วงหลุดได้ง่าย ละอองเรณูจับเป็นก้อนแข็ง (pollinia) มีก้าน (stipe) และฐานหรือแป้นยึดก้าน (disc) ได้เกสรเพศผู้ลงมา จะเป็นแอ่งเกสรเพศเมีย (stigma surface) ซึ่งจะมีน้ำเหนียวๆ อยู่เต็มแอ่ง บริเวณก้านดอกส่วนที่อยู่ชิดกับโคนกลีบดอก ซึ่งจะมีขนาดใหญ่กว่าก้านดอกที่ต่ำลงไป ก้านดอกส่วนนี้จะเป็นที่อยู่ของรังไข่ ภายในรังไข่จะมีไข่อ่อนเป็นเม็ดเล็กๆ อยู่มากมาย (มาลินี, 2542) เมื่อไข่เหล่านี้ได้รับการผสมก็จะเจริญกลายเป็นเมล็ด ส่วนรังไข่จะเจริญเป็นฝักในที่สุด

ฝัก หรือผลของแวนด้า มักจะติดอยู่กับก้านในลักษณะตั้งเอาปลายชี้ขึ้น ภายในฝักจะมีเมล็ดซึ่งมีขนาดเล็กเหมือนฝุ่นผง ในแต่ละฝักจะมีเมล็ดเป็นจำนวนมาก (ระพี, 2530) เมล็ดมีน้ำหนักรเบา เนื่องจากไม่มีอาหารสะสม (endosperm) ทำให้สามารถปลิวไปตามลมได้ง่าย และเป็นระยะทางไกล (กรรชิต, 2547)

กล้วยไม้สกุลแวนด้า จัดเป็นกล้วยไม้สกุลหลัก ในบรรดากล้วยไม้สกุลต่างๆ ในประเภทโมโนโพเดียลที่มีดอกสวยงาม เนื่องจากมีลักษณะเด่นหลายประการ เช่น ความสวยงามของดอกที่มีขนาดใหญ่ สีสด และแปลก ดอกบานทน ช่อดอกมีก้านแข็ง ช่อยาว และรูปทรงสวยได้สัดส่วน จึงได้รับความนิยมอย่างกว้างขวาง และเลี้ยงกันมากในประเทศไทย ไม่ยิ่งหย่อนกว่ากล้วยไม้สกุลหวาย และสกุลแคทลียา ที่เป็นเช่นนี้ก็เพราะกล้วยไม้สกุลนี้มีลักษณะดี (ไชยา, 2534) คือ

1. ปลูกเลี้ยงง่าย เจริญงอกงามได้ดี เนื่องจากกล้วยไม้สกุลนี้ชอบอากาศร้อน ชื้น และมีแสงแดดเพียงพอ ดังสภาพของประเทศไทย
2. มีความสำคัญในการตัดดอก รองจากกล้วยไม้สกุลหวาย
3. สามารถใช้ผสมปรับปรุงพันธุ์ได้อย่างกว้างขวาง ทั้งการผสมในสกุลเดียวกัน และผสมข้ามสกุล

4. ลูกผสมที่เกิดขึ้น มีลักษณะและสีสันเปลี่ยนไป ทำให้ได้กล้วยไม้ใหม่ที่สวยงามยิ่งขึ้น

3. เทคนิคพีซีอาร์ (PCR, Polymerase chain reaction)

ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (polymerase chain reaction) หรือพีซีอาร์ เป็นเทคนิคที่ใช้เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมาย ซึ่งอยู่ในสารละลายรวมกับดีเอ็นเออื่น โดยไม่จำเป็นต้องทำให้ชิ้นดีเอ็นเอดังกล่าวบริสุทธิ์ก่อน สามารถแยกส่วนของดีเอ็นเอที่สนใจโดยไม่ต้องนำไปขยายเพิ่มปริมาณในเซลล์หรือนำไปโคลน การทำพีซีอาร์ คือ การสังเคราะห์ดีเอ็นเอโดยใช้เอนไซม์ดีเอ็นเอโพลีเมอเรส ซ้ำกันหลายๆ รอบ เพื่อให้ได้ดีเอ็นเอปริมาณเพิ่มขึ้นเป็นทวีคูณ การสังเคราะห์ดีเอ็นเอจะเกิดขึ้นได้ จำเป็นต้องมีไพรเมอร์ด้วย ดังนั้นจึงใช้ไพรเมอร์ 2 ชนิด ที่มีเบสคู่สมกับปลายทั้ง 2 ด้านของดีเอ็นเอบริเวณที่ต้องการเพิ่มปริมาณ โดยไพรเมอร์จะเกาะกับดีเอ็นเอคนละสาย และมีปลาย 3' ในทิศทางเข้าหากัน ดังนั้นข้อกำหนดในการทำพีซีอาร์ ก็ต้องทราบลำดับเบสของดีเอ็นเอบริเวณที่ต้องการเพิ่มปริมาณ ซึ่งอาจทราบลำดับเบสทั้งหมดหรือทราบเฉพาะส่วนปลายก็ได้ เพื่อการออกแบบสังเคราะห์ไพรเมอร์มาใช้ในปฏิกิริยาต่อไป บริเวณหรือชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่เกิดการสังเคราะห์เพิ่มปริมาณขึ้น จะมีขนาดความยาวเท่ากับชิ้นดีเอ็นเอจากปลาย 5' ของไพรเมอร์หนึ่งถึงปลาย 5' ของไพรเมอร์อีกชนิดหนึ่งนั่นเอง (สุรินทร์, 2545)

ไพรเมอร์ที่ใช้เป็นโอลิโกนิวคลีโอไทด์ความยาวประมาณ 20-35 เบส วิธีทำคือสกัดดีเอ็นเอออกจากเซลล์ นำมาใส่รวมกับไพรเมอร์ บัฟเฟอร์ คือออกซิไรโบนิวคลีโอไซด์ไตรฟอสเฟต (dNTP) ทั้ง 4 ชนิด ทำให้ดีเอ็นเอต้นแบบแยกเป็นสายเดี่ยว (denaturation) โดยใช้ความร้อน แล้วลดอุณหภูมิลงอย่างรวดเร็ว เพื่อให้ไพรเมอร์ที่มีเบสเป็นคู่สมกับส่วนปลายของชิ้นดีเอ็นเอเป้าหมาย และมีปริมาณมากกว่าชิ้นดีเอ็นเออื่นๆ มากมาย เข้ามาจับคู่กับส่วนของดีเอ็นเอที่ต้องการ (annealing) ขั้นสุดท้ายจึงเปลี่ยนอุณหภูมิให้พอเหมาะกับการทำงานของเอนไซม์ดีเอ็นเอโพลีเมอเรสที่ใส่ลงในปฏิกิริยา เอนไซม์จะทำหน้าที่สังเคราะห์ดีเอ็นเอต่อจากไพรเมอร์ (primer extension) โดยมีดีเอ็นเอเป้าหมายเดิมเป็นต้นแบบ เมื่อปฏิกิริยาดำเนินไปครบทั้ง 3 ขั้นตอน โมเลกุลดีเอ็นเอเป้าหมายจะเพิ่มขึ้นเป็น 2 เท่า ดังนั้นถ้าดำเนินปฏิกิริยาซ้ำกันหลายๆ รอบ ปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายจะเพิ่มขึ้นจนถึง 2^n เท่า เมื่อปฏิกิริยาผ่านไป n รอบ (สุรินทร์, 2545)

4. เครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA marker)

เครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA marker) หมายถึง ดีเอ็นเอที่ใช้เป็นเครื่องหมายบ่งชี้ความจำเพาะของสิ่งมีชีวิตตัวหนึ่ง สายพันธุ์หนึ่ง สปีชีส์หนึ่ง หรือในระดับต่างสปีชีส์ โดยเป็นดีเอ็นเอที่อยู่ในตำแหน่งหนึ่งบนโครโมโซม (nuclear DNA) หรือดีเอ็นเอในออร์แกเนลล์ (mitochondrial DNA หรือ chloroplast DNA) การที่สามารถใช้ดีเอ็นเอเป็นเครื่องหมายได้เนื่องจากเกิดความแปรปรวน (variation) ของนิวคลีโอไทด์ในโมเลกุลดีเอ็นเอ หรือเกิดโพลิมอร์ฟิซึม (polymorphism) ของลำดับเบสในโมเลกุลของดีเอ็นเอ (สุรินทร์, 2545)

วิธีการตรวจสอบโพลิมอร์ฟิซึมของดีเอ็นเอ (DNA polymorphism) ทำได้โดยการหาลำดับเบสในโมเลกุลของดีเอ็นเอ (DNA sequencing) หรือตรวจสอบโดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ ซึ่งการตรวจสอบเครื่องหมายดีเอ็นเอสามารถทำได้หลายวิธี เช่น ใช้การไฮบริไดเซชันด้วยวิธี RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) ใช้การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธีพีซีอาร์ โดยมีวิธีที่แตกต่างกันไป เช่น RAPD (Random amplified polymorphic DNA) (William *et al.*, 1990) AFLP (Amplified fragment length polymorphism) (Vos *et al.*, 1995) SRAP (Sequence-related amplified polymorphism) (Li and Quiros, 2001) การศึกษาโพลิมอร์ฟิซึมของดีเอ็นเอชุดซ้ำสั้นๆ (VNTR) รวมทั้งการศึกษาดีเอ็นเอในออร์แกเนลล์ต่างๆ ด้วยวิธีพีซีอาร์

5. การจำแนกพันธุ์กล้วยไม้โดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ

ในปัจจุบันการพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอเพื่อใช้จำแนกพันธุ์ของกล้วยไม้ มีการทำกันอย่างแพร่หลาย ทั้งทางด้านชนิดพันธุ์ของกล้วยไม้และชนิดของเครื่องหมายดีเอ็นเอที่ใช้ อาทิเช่น ใช้เทคนิค RAPD ในการจำแนกกล้วยไม้สกุลแวนด้าฟ้ามุ่ย แวนด้าแซนเดอเรียน่า และลูกผสม โดยใช้ไพรเมอร์ 9 คู่ ทำให้เกิดแถบดีเอ็นเอ 126 แถบ พบว่าแวนด้าฟ้ามุ่ย และแซนเดอเรียน่า มีดัชนีความเหมือนระหว่างชนิด 0.28 และมีดัชนีความเหมือนภายในชนิด 0.62 และ 0.48 ตามลำดับ (ดวงพร, 2543) ใช้ศึกษาความสัมพันธ์ของกล้วยไม้สกุลแวนด้า และสรุปว่า ควรแยก *Vanda teres* และ *Vanda hookeriana* ให้อยู่ในสกุล *Papilionanthe* ส่วน *Vanda sanderiana* ก็ให้จัดอยู่ในสกุลแวนด้าเช่นเดิม (Lim *et al.*, 1999) และยังใช้เทคนิค RAPD ในการศึกษาโพลิมอร์ฟิซึมในกล้วยไม้สกุลแคทลียา (*Cattleya*) โดยใช้ไพรเมอร์จำนวน 10 ชนิด พบว่ามีไพรเมอร์ 9 ชนิด ที่ทำให้เกิดลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่เป็นเอกลักษณ์ โดยมีดัชนีความเหมือนอยู่ในช่วง 0.22-0.61 (Benner *et al.*, 1995) และมี

การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างชนิดของกล้วยไม้รองเท้านารี หมวด *Brachypetalum* จำนวน 6 ชนิด โดยใช้ไพรเมอร์ 8 คู่ โดยประเดิม (2543) ได้รายงานผลว่าไม่พบลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่เป็นเอกลักษณ์ แต่สามารถหาความสัมพันธ์ของกล้วยไม้รองเท้านารีทั้ง 6 ชนิดได้จากแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้น 122 แถบ และสร้างเป็น dendrogram ได้ สำหรับกล้วยไม้ออนซิเดียม (*Oncidiinae*) ก็มีการศึกษาความสัมพันธ์โดยใช้เทคนิค RAPD เช่นกัน โดยพบว่ามีไพรเมอร์ 14 ชนิด ที่ทำให้เกิดแถบดีเอ็นเอเฉพาะในกล้วยไม้ออนซิเดียมที่ศึกษาจำนวน 24 ชนิด มีค่าดัชนีความเหมือนอยู่ในช่วง 0.25-0.71 และสามารถแบ่งกลุ่มกล้วยไม้ดังกล่าวได้เป็น 6 กลุ่ม (Tsai *et al.*, 2002) นอกจากนี้ยังมีการใช้เทคนิค RAPD ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมในกล้วยไม้อื่นๆ อีก เช่น กล้วยไม้เข็มขี้เหล็ก (*Cymbidium*) (Choi *et al.*, 2006) เป็นต้น

นอกจากเทคนิค RAPD แล้ว ยังมีการใช้เครื่องหมาย allozyme ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม และวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของกล้วยไม้ *Pterostylis* จำนวน 6 ชนิด โดย Sharma *et al.* (2001) พบว่าเครื่องหมาย allozyme สามารถแยกความแตกต่างระหว่างประชากรกล้วยไม้ *Pterostylis* ได้อย่างชัดเจน โดยมีดัชนีความเหมือนภายในประชากร อยู่ในช่วง 0.859-0.877 และใช้เครื่องหมาย RAPD ร่วมกับ allozyme ในการตรวจหาความผันแปรทางพันธุกรรมของประชากรกล้วยไม้ 3 ชนิด (Sun and Wong, 2001) พบว่า ไม่มีความผันแปรของ allozyme ที่เป็นลักษณะเฉพาะของกล้วยไม้ ทั้ง 3 ชนิด แต่ในเครื่องหมาย RAPD พบว่ามีความผันแปรทางพันธุกรรมภายในประชากรของ *Zeuxine garacilis* และ *Eulophia sinensis* แต่ในประชากรของ *Z. strateumatica* พบว่ามีความผันแปรเพียงเล็กน้อยเท่านั้น และพบว่ารูปแบบความผันแปรทางพันธุกรรม มีความสัมพันธ์กับระบบการผสมพันธุ์อย่างชัดเจน

เทคนิค AFLP เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเออีกชนิดหนึ่ง ที่มีผู้นำมาใช้ในการจำแนกกล้วยไม้สกุลแวนด้า โดย Chen *et al.* (1999) ได้ตรวจสอบรูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากเนื้อเยื่อส่วนต่างๆ ของกล้วยไม้ เช่น ใบ และดอก ที่เก็บในเวลาต่างกัน โดยใช้ไพรเมอร์ *EcoRI*+4 และ *MseI*+3 พบโพลิมอร์ฟิซึมในลูกผสมคู่เดียวกัน มากกว่า 10 เบอ์เซ็นต์ และพบโพลิมอร์ฟิซึมจากการกลายของโคลนเดียวกันเพียง 0.3-0.7 เบอ์เซ็นต์

สำหรับกล้วยไม้สกุลหวาย Tsai *et al.* (2004) ได้ศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมจากการวิเคราะห์ลำดับเบสส่วน ITS (internal transcribed spacer) ในกล้วยไม้ของไต้หวันจำนวน 12 ชนิด และจากการหาระยะห่างทางพันธุกรรม (genetic distance) พบว่าควรแยก *D. furcatopedicellatum*

และ *D. somai* ออกจากกล้วยไม้สกุลหวาย ในปีต่อมา สุรินทร์ และคณะ (2548) ได้ทำการตรวจสอบดีเอ็นเอโดยโคลนส่วนของ ITS มาหาลำดับเบส และออกแบบไพรเมอร์ แล้วนำไพรเมอร์ที่ได้มาตรวจสอบกับตัวอย่างกล้วยไม้สกุลหวายจำนวน 47 ตัวอย่าง โดยตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 6 ชนิด พบว่าสามารถแยกตัวอย่างกล้วยไม้พันธุ์พื้นเมืองและพันธุ์การค้าได้เกือบทั้งหมด

นอกจากนี้ ยังมีการจำแนกกล้วยไม้สกุลหวาย โดยการสร้างโพรบที่มีความจำเพาะกับกล้วยไม้ชนิดต่างๆ (species-specific probe) ด้วยเทคนิค suppression subtraction hybridization (SSH) และ DNA array โดย Li และคณะ (2004) รายงานว่าเทคนิคนี้มีประสิทธิภาพสูงในการจำแนกกล้วยไม้ด้วยโพรบที่จำเพาะเจาะจง

6. เครื่องหมายไมโครแซเทลไลท์ (Microsatellite Marker)

ไมโครแซเทลไลท์ (Microsatellite) หมายถึง ลำดับเบสที่มีลักษณะซ้ำกันเรียงอยู่ต่อเนื่องกันที่ตำแหน่งหนึ่งๆ ในจีโนม แต่ละชุดซ้ำประกอบด้วยเบส 1-6 เบส ชุดที่ซ้ำกันนี้จะอยู่ติดกันแบบหัวต่อหาง เช่น $(A)_n$, $(CA)_n$, $(TCC)_n$ และ $(GATA)_n$ เป็นต้น เมื่อ n คือจำนวนชุดซ้ำ พบในสิ่งมีชีวิตทุกชนิดที่ศึกษา มีวิธีเรียกแบบอื่น ได้แก่ simple sequence repeat (SSR) หรือ short tandem repeat (STR) ลำดับเบสแบบไมโครแซเทลไลท์นี้มีการกระจายตัวทั้งจีโนม แต่ไม่สม่ำเสมอ บางบริเวณก็พบมาก บางบริเวณก็พบน้อยกว่า ตามแต่ชนิดของสิ่งมีชีวิต การกระจายตัวของไมโครแซเทลไลท์ส่วนใหญ่อยู่ในบริเวณที่ไม่ใช่ยีน หรือส่วนนำรหัสของยีน (noncoding region) (สุรินทร์, 2549)

ลักษณะของไมโครแซเทลไลท์ดีเอ็นเอ สามารถจำแนกได้เป็น 3 ประเภท (Weber and May, 1990) ดังนี้

1. Perfect repeat เป็นไมโครแซเทลไลท์ที่มีลำดับเบส 2 ตัว หรือมากกว่า เรียงซ้ำกันไปเรื่อยๆ เช่น $(CA)_n$
2. Compound repeat เป็นไมโครแซเทลไลท์ที่มีลำดับเบสหลายชนิดเรียงต่อกัน เช่น $(CA)_n(GT)_n$
3. Imperfect repeat เป็นไมโครแซเทลไลท์ที่มีเบสอื่นเข้ามาแทรกในลำดับเบสซ้ำ ซึ่งเกิดจากการกลาย เช่น $(CA)_n(N)_n(CA)_n$

หน้าที่ของไมโครแซทเทลไลต์ ยังไม่ทราบแน่ชัด มีไมโครแซทเทลไลต์บางส่วนที่มีการอนุรักษ์ (conserved) โดยพบอยู่ที่ตำแหน่งเดียวกันในสิ่งมีชีวิตหลายชนิด บางส่วนทำหน้าที่ได้เนื่องจากอยู่ในส่วนนำรหัสของยีน นอกจากนี้ยังพบว่าไมโครแซทเทลไลต์บางชนิด สามารถจับกับโปรตีนที่จำเพาะ และทำหน้าที่เป็นตัวกระตุ้นการแสดงออกของยีน (enhancer) โดยความแปรปรวนของจำนวนซ้ำ มีผลต่อการควบคุมการทำงานของยีน ลำดับเบสของไมโครแซทเทลไลต์บางแบบยังมีผลต่อโครงสร้างของโครมาตินด้วย (Godldstein and Schlötterer, 1999)

ลำดับเบสแบบไมโครแซทเทลไลต์เป็นลำดับเบสที่ไม่เสถียร มีอัตราการกลายพันธุ์สูงกว่าลำดับเบสทั่วไป โดยการกลายพันธุ์ของไมโครแซทเทลไลต์มักเกิดจากการขาดหายไปของลำดับเบสซ้ำ (deletion) หรือการเพิ่มขึ้นของลำดับเบสซ้ำ (insertion) ต่างจากลำดับเบสทั่วไปที่มักเกิดการกลายแบบการแทนที่เบส โดยการเพิ่มขึ้นหรือลดลงของชุดซ้ำมีกลไก 2 แบบ คือการเลื่อนของสายดีเอ็นเอที่จับคู่กันขณะเกิดการจำลองโมเลกุล (Slip-strand mispairing) หรือที่เรียกว่าเกิด slippage (Levinson and Gutman, 1987) และการแลกเปลี่ยนชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ไม่เท่ากัน (unequal crossing over) (Richard and Pâques, 2000)

เนื่องจากลำดับเบสแบบไมโครแซทเทลไลต์ มีอัตราการกลายพันธุ์สูงประกอบกับการกระจายอยู่ทั่วไปในจีโนม จึงมีการนำดีเอ็นเอในส่วนนี้มาใช้ศึกษาในทางพันธุกรรมกันอย่างกว้างขวาง ทั้งในด้านการใช้เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอในการทำแผนที่โครโมโซม การศึกษาวิวัฒนาการ และความสัมพันธ์ของสิ่งมีชีวิต โดยเฉพาะในสิ่งมีชีวิตที่มีความแปรปรวนในระดับดีเอ็นเอต่ำ (Areshchenkova and Ganai, 2002)

การตรวจสอบดีเอ็นเอส่วนที่เป็นไมโครแซทเทลไลต์ ทำได้หลายวิธี ได้แก่ การทำ Southern blot hybridization โดยตัดจีโนมมิกดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ แยกขนาดดีเอ็นเอโดยการทำอิเล็กโตรโฟรีซิส ย้ายแถบดีเอ็นเอไปบนแผ่นเมมเบรน แล้วไฮบริไดซ์กับโพรบที่เป็นส่วนของไมโครแซทเทลไลต์ เช่น (CA)₁₀ วิธีนี้จะตรวจสอบดีเอ็นเอบริเวณที่มีลำดับเบสเป็นไมโครแซทเทลไลต์ แบบใดแบบหนึ่งตามชนิดของโพรบจากหลายตำแหน่งพร้อมๆ กัน (multi-locus marker) หรืออาจดัดแปลงมาใช้เทคนิคพีซีอาร์ โดยสังเคราะห์ไพรเมอร์ที่มีลำดับเบสแบบไมโครแซทเทลไลต์ นำมาใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้ไพรเมอร์เพียงชนิดเดียว โดยไพรเมอร์จะไปจับกับลำดับเบสของไมโครแซทเทลไลต์ชนิดเดียวกันได้หลายตำแหน่ง และเกิดการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้จากหลายบริเวณ วิธีนี้เรียกว่า microsatellite primed PCR (MP-PCR) จากวิธีนี้มีการประยุกต์ใช้ไพร

เมอร์ที่เพิ่มเบสอื่นที่ไม่ได้เป็นส่วนของชุดซ้ำ เข้าที่ปลายของไพรเมอร์เดิมอีก 1-3 เบส เพื่อให้การจับตัวของไพรเมอร์กับตำแหน่งไมโครแซทเทลไลต์ในจีโนมมีความจำเพาะมากขึ้น โดยส่วนของดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้ คือบริเวณที่อยู่ระหว่างส่วนของไมโครแซทเทลไลต์ที่ใช้เป็นไพรเมอร์ จึงมีชื่อเรียกใหม่ว่า inter simple sequence repeat (ISSR) ซึ่งเป็นเครื่องหมายที่ตรวจสอบดีเอ็นเอได้หลายตำแหน่งพร้อมกัน โดยไม่จำเป็นต้องทราบข้อมูลลำดับเบสใดๆ ในจีโนมมาก่อน (สุรินทร์, 2549)

เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ที่นิยมใช้ในปัจจุบัน เป็นการตรวจสอบไมโครแซทเทลไลต์ชนิดใดชนิดหนึ่งที่ตำแหน่งจำเพาะ ครั้งละ 1 ตำแหน่ง (single-locus marker) โดยเทคนิคพีซีอาร์ จึงต้องใช้ไพรเมอร์ 2 ชนิด ที่มีลำดับเบสเป็นคู่สมกับลำดับเบสที่อยู่ขนานข้างของไมโครแซทเทลไลต์ (flanking DNA) ที่ตำแหน่งดังกล่าว และจำเป็นต้องมีข้อมูลลำดับเบสที่ต้องการ ดังนั้นจึงต้องพัฒนาเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์สำหรับสิ่งมีชีวิตที่ต้องการศึกษาก่อน (สุรินทร์, 2549)

วิธีการพัฒนาเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ แบบดั้งเดิมนั้น จะใช้เทคนิคทางด้านพันธุศาสตร์โมเลกุล เตรียมห้องสมุดจีโนม (genomic library) โดยการตัดจีโนมิกดีเอ็นเอ (genomic DNA) ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme) แล้วเชื่อมชิ้นดีเอ็นเอดังกล่าวกับดีเอ็นเอพาหะ (DNA vector) ถ่ายเข้าสู่แบคทีเรียเพื่อเพิ่มจำนวน จากนั้นคัดเลือกโคลนโดยการไฮบริดเซชันกับโพรบที่เป็นไมโครแซทเทลไลต์ (SSR probe) แล้วแยกดีเอ็นเอออกจากแบคทีเรียเพื่อหาลำดับเบสที่อยู่ขนานข้างกับไมโครแซทเทลไลต์ดีเอ็นเอ และออกแบบไพรเมอร์ ซึ่งเป็นวิธีการที่ยุ่งยากและใช้เวลานาน (He *et al.*, 2003) ในปัจจุบันการพัฒนาเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์นิยมใช้วิธี enrichment โดยการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอรวมกับการไฮบริดเซชันชิ้นดีเอ็นเอกับโพรบที่เป็นไมโครแซทเทลไลต์ที่ติดปลายด้วยไบโอติน (biotin) และแยกชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการด้วย magnetic bead ที่หุ้มด้วย streptavidin (Edwards *et al.*, 1996) ซึ่งหลังจากกำจัดดีเอ็นเอส่วนเกินออกไปแล้วจะมีชิ้นดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสแบบไมโครแซทเทลไลต์ 50-90 เปอร์เซ็นต์ ก่อนจะเชื่อมกับดีเอ็นเอพาหะต่อไป (Butcher *et al.*, 2000) วิธีการ enrichment นี้มีประสิทธิภาพสูง และใช้เวลาในการพัฒนาน้อยกว่าวิธีดั้งเดิม (Billotte *et al.*, 2001) จากข้อดีของวิธี enrichment จึงมีผู้ใช้วิธีนี้พัฒนาการหาเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์เพื่อตรวจสอบสิ่งมีชีวิตกันอย่างกว้างขวาง

การพัฒนาเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์มีวิธีการที่ยุ่งยาก และเสียค่าใช้จ่ายสูง แต่หลังจากการพัฒนาเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ได้แล้ว สามารถนำไปใช้ได้ง่าย เนื่องจากเป็น

เครื่องหมายดีเอ็นเอที่ใช้วิธีการเพิ่มปริมาณโดยวิธีพีซีอาร์ จึงต้องการดีเอ็นเอต้นแบบปริมาณน้อย และชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ต้องการตรวจสอบก็มีขนาดเล็ก จึงใช้ดีเอ็นเอตัวอย่างที่ไม่ต้องมีคุณภาพมากนัก นอกจากนี้ ผลการตรวจสอบยังมีความแม่นยำ สามารถส่งข้อมูลลำดับเบสของไพรเมอร์เพื่อนำไปใช้ที่ห้องปฏิบัติการใดก็ได้ มีโพลิมอร์ฟิซึมสูง และยังมีการข่มแบบ codominance จึงสามารถแยกความแตกต่างระหว่างโฮโมไซโกต และเฮเทอโรไซโกตได้ มีการกระจายทั่วทั้งจีโนม เหมาะสำหรับการทำแผนที่จีโนม ตรวจสอบเอกลักษณ์ของสิ่งมีชีวิต ตรวจสอบความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม และสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในด้านต่างๆ อีกมากมาย (สุรินทร์, 2549)

7. การใช้เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ในการตรวจสอบกล้วยไม้

งานวิจัยเกี่ยวกับการใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดไมโครแซทเทลไลต์ ในกล้วยไม้ มีการนำเสนอออกมามากมาย อาทิเช่น Lim *et al.* (2007) ได้พัฒนาเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ จำนวน 13 เครื่องหมาย จากกล้วยไม้แวนด้า Miss Joaquim และนำมาตรวจสอบโพลิมอร์ฟิซึมกับกล้วยไม้แวนด้าพันธุ์อื่นอีก 4 ชนิด แวนด้าลูกผสม 11 ชนิด และอะแรนด้าอีก 1 ชนิด โดยพบว่ามีจำนวนแอลลีลตั้งแต่ 2-19 แอลลีลต่อตำแหน่ง และศึกษาประชากรของ *V. sumatrana* พบว่ามีค่า H_o อยู่ในช่วง 0-0.76 และมีค่า H_e อยู่ในช่วง 0-1

ในปี 2548 ได้มีการใช้เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ ในการศึกษาความสัมพันธ์ของกล้วยไม้สกุลหวาย (จุลภาค และคณะ, 2548) ตรวจสอบจีโนไทป์ของกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์การค้า 12 พันธุ์ โดยใช้เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ 16 ตำแหน่ง พบว่ามีจำนวนแอลลีลทั้งสิ้น 92 แอลลีล เฉลี่ย 5.75 แอลลีลต่อตำแหน่ง สามารถแยกความแตกต่างของพันธุ์กล้วยไม้ทั้ง 12 พันธุ์ได้อย่างชัดเจน และใช้เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ในการตรวจสอบพันธุ์ประวัติ และสร้างฐานข้อมูลของกล้วยไม้สกุลหวายในประเทศไทยอีกด้วย และในปีถัดมา Yue *et al.* (2006) ก็ได้พัฒนาเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ในกล้วยไม้สกุลหวายเช่นกัน โดยใช้เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ 14 เครื่องหมาย ในการตรวจหาโพลิมอร์ฟิซึมของกล้วยไม้สกุลหวาย 42 พันธุ์ พบว่ามีจำนวนแอลลีลต่อตำแหน่งเฉลี่ย 12.0 ± 1.9 และมีค่า H_o เฉลี่ย 0.70

นอกจากนี้ มีการตรวจสอบกล้วยไม้ *Gymnadenia conopsea* โดยใช้เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ จากห้องสมุดจีโนมแบบ unenriched และ enriched พบเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ 6 ตำแหน่ง มีจำนวนแอลลีล 4-10 แอลลีลต่อตำแหน่ง และมีค่า degree of polymorphism สูง

($H_o = 0.40-0.90$ และ $H_e = 0.54-0.88$) (Gustafsson and Thoren, 2001) และมีรายงานการศึกษากล้วยไม้ *Gymnadenia conopsea* โดยใช้เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์อีกครั้งในปี 2002 โดยออกแบบไพรเมอร์จากไมโครแซทเทลไลต์ 7 คู่ และพบว่าเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ 4 คู่ที่มีโพลิมอร์ฟิซึมสูง โดยมี 16-25 แอลลีลต่อตำแหน่ง และมีค่า H_o และ H_e อยู่ในช่วง 0.36-0.67 และ 0.37-0.82 ตามลำดับ (Compebell *et al.*, 2002) และมีการเปรียบเทียบความหลากหลายทางพันธุกรรมของกล้วยไม้ *Gymnadenia odoratissima* กับ *G. conopsea* โดยใช้เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ (Gustafsson and Sjögren-Gulve, 2002) พบว่า *G. odoratissima* มีความผันแปรทางพันธุกรรมภายในประชากรต่ำ และมีความผันแปรทางพันธุกรรมระหว่างประชากรสูงกว่า *G. conopsea* โดย *G. conopsea* มี $H_e = 0.6-0.8$ และ $F_{ST} = 0.06$ ส่วน *G. odoratissima* มี $H_e = 0.3-0.7$ และ $F_{ST} = 0.19$

ในกล้วยไม้ *Serapias vomeracea* มีการศึกษาความผันแปรทางพันธุกรรม โดยใช้ไพรเมอร์จำนวน 18 คู่ และพบว่าไพรเมอร์ 6 คู่ มีความผันแปรทางพันธุกรรมสูง โดยมีจำนวนแอลลีล 3-6 แอลลีลต่อตำแหน่ง และมี H_o อยู่ในช่วง 0.35-0.86 (Pellegrino *et al.*, 2001) นอกจากนี้ Pellegrino *et al.* (2004) ยังใช้เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ ในการจำแนกกล้วยไม้ *Serapias* ชนิดต่างๆ และคาดว่าจะสามารถทำนายวิวัฒนาการของกล้วยไม้สายพันธุ์นี้ได้

8. การประยุกต์ใช้เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ในพืชชนิดอื่น

เนื่องจากเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอที่มีประสิทธิภาพสูง จึงเป็นที่นิยมนำมาศึกษา และมีการนำเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ ไปใช้ประโยชน์ในด้านต่างๆ มากมาย เช่น

1. ใช้ในการจำแนกพันธุ์พืช และตรวจสอบความบริสุทธิ์ของสายพันธุ์

ในประเทศไทยมีการใช้เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ ในการตรวจสอบความบริสุทธิ์ทางพันธุกรรมของเมล็ดพันธุ์ลูกผสมในมะเขือเทศจำนวน 8 พันธุ์ โดยใช้ไพรเมอร์ 9 คู่ สามารถบอกความแตกต่างในระดับจีโนมไทป์ระหว่างพ่อ และแม่ได้ (ณัญยา, 2545) และใช้จำแนกข้าวที่มีกลิ่นหอม (ข้าวดอกมะลิ 105, กข 15 และ กข 6) ออกจากข้าวที่ไม่มีกลิ่นหอม (ชัยนาท 1) โดยใช้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อไมโครแซทเทลไลต์ดีเอ็นเอในตำแหน่ง (locus) RM 17 ในจีโนมของข้าว

โดยพบว่าข้าวที่มีกลิ่นหอม จะมีจำนวนซ้ำของนิวคลีโอไทด์ CT ของเครื่องหมาย RM 17 มากกว่าข้าวที่ไม่มีกลิ่นหอม (ปรีชา และปีย์วรา, 2548) นอกจากนี้ มีงานวิจัยเกี่ยวกับการใช้เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม หรือตรวจสอบโพลิมอร์ฟิซึมในพืชต่างๆ เช่น ในมันเทศ (Zhang *et al.*, 1999), ฝ้าย (Reddy *et al.*, 2001), ถั่วลิสง (He *et al.*, 2003), สอพ (Stajner *et al.*, 2005), ฝั่ (Nayak and Rout, 2005), หม่อน (Zhao *et al.*, 2005), ลิ้นจี่ (Li *et al.*, 2006), ฝ้าย (Bertini *et al.*, 2006) และลูกพีช (Bouhadida *et al.*, 2007) เป็นต้น

2. ใช้ในการทำแผนที่ยีนหรือจีโนมและติดตามยีนที่สนใจ

จากการที่เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ เป็นเครื่องหมายพันธุกรรมที่มีความหลากหลายสูง จึงมีการนำมาใช้ประโยชน์ในการสร้างแผนที่ยีนในพืชหลายชนิด เช่น นำไปใช้ทำแผนที่ยีนในถั่วแดง (*Phaseolus vulgaris*) Gaitán-Solís *et al.* (2002) พบว่ามีจำนวนแอลลิลอยู่ในช่วง 1-14 แอลลิลต่อตำแหน่ง โดยมีค่าเฉลี่ยอยู่ที่ 6 แอลลิลต่อคู่ไพรเมอร์ Gupta *et al.* (2002) ได้พัฒนาเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ เพื่อใช้ในการทำแผนที่ยีนในข้าวสาลี พบว่าจากไพรเมอร์ทั้งหมด 176 คู่ มี 58 คู่ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ 66 ตำแหน่ง และแสดงโพลิมอร์ฟิซึมในประชากร นอกจากนี้ ในแดงไทยก็มีการใช้เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ ในการวิเคราะห์แผนที่ทางพันธุกรรม (genetic linkage) และ ความต่างทางพันธุกรรม (genetic distance) ระหว่างแดงชนิดต่างๆ และใช้เป็นเครื่องหมายโมเลกุลในแดงชนิดอื่นๆ (Ritschel *et al.*, 2004)

การใช้เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ในการติดตามยีนต่างๆ โดยส่วนใหญ่จะใช้ในการติดตามยีนต้านทานโรค เช่น ยีนต้านทานโรค frog eye leaf spot (FLS) ในถั่วเหลือง (Yang *et al.*, 2001) ยีนต้านทานโรค sheath blight ในข้าว (Che *et al.*, 2003) สำหรับในข้าวสาลีมีการติดตามยีนต้านทานโรค *Fusarium* head blight (Wei *et al.*, 2005) และยีนต้านทานเชื้อรา (powdery mildew) (Chen *et al.*, 2005; Zhu *et al.*, 2005) นอกจากนี้ยังใช้เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ในการติดตามยีนควบคุมสีของเมล็ดใน *Brassica juncea* (Padmaja *et al.*, 2005) เพื่อปรับปรุงคุณภาพของน้ำมันในเมล็ดให้ดีขึ้นอีกด้วย

สำหรับในประเทศไทย มีการใช้เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ ช่วยในการคัดเลือกพริกที่มีลักษณะต้านทานต่อโรค โดยใช้โปรแกรม 5 คู่ พบว่าเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ สามารถใช้คัดเลือกลักษณะที่ต้องการ ได้อย่างมีประสิทธิภาพ ซึ่งเป็นประโยชน์ในการปรับปรุงพันธุ์ต่อไป (อรรรัตน์, 2543)

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. กล้วยไม้สกุลแวนด้าพันธุ์ต่างๆ

จำนวน 33 ตัวอย่าง ดังนี้

- | | |
|--|---|
| 1. <i>Vanda</i> Robert's Delight | 18. <i>Vanda</i> Robert's Delight 'Krugao' |
| 2. <i>Vanda</i> Gorgon Dillon | 19. <i>Vanda</i> Robert's Delight 'Black' |
| 3. <i>Vanda</i> Golamco's Blue Magic | 20. <i>Rhynchovanda</i> Colmari |
| 4. <i>Vanda</i> Manuvadee | 21. <i>Ascocenda</i> Princess Mikasa Pink |
| 5. <i>Vanda</i> Yellow | 22. <i>Ascocenda</i> Princess Mikasa Blue |
| 6. <i>Vascostylis</i> Pine River Blue | 23. <i>Vanda</i> Sansai Blue |
| 7. <i>Vanda denisoniana</i> | 24. <i>Vanda</i> Bangkok White |
| 8. <i>Vanda</i> Thanuntes x Manuvadee | 25. <i>Vanda</i> Rasri Gold |
| 9. <i>Vanda</i> Lumpini Red x Manuvadee | 26. <i>Vanda coerulea</i> 'Red' |
| 10. <i>Vanda</i> (Rattana x Siriluk) x Manuvadee | 27. <i>Vanda teres</i> (แวนด้าใบกลม) |
| 11. <i>Vanda</i> Dares x Kultana | 28. <i>Vanda</i> Miss Joaquim (แวนด้าใบกลม) |
| 12. <i>Vanda</i> Pachara Delight | 29. <i>Vanda</i> Doctor Anek |
| 13. <i>Vanda</i> Wirat | 30. <i>Aranda</i> Christine |
| 14. <i>Vanda</i> Robert's Delight '#31' | 31. <i>Aranda</i> Woleco (<i>Vanda</i> Doctor Anek x
<i>Aranda</i> Christine) |
| 15. <i>Vanda</i> Robert's Delight '#56' | 32. <i>Vanda sanderiana</i> |
| 16. <i>Vanda</i> Robert's Delight '#358' | 33. <i>Vanda</i> Doctor Anek x <i>Vanda</i>
<i>sanderiana</i> |
| 17. <i>Vanda</i> Robert's Delight '#888' | |

วิธีการ

1. การสกัดดีเอ็นเอจากกล้วยไม้

สกัดดีเอ็นเอจากกล้วยไม้สกุลแวนด้า โดยใช้วิธีที่ประยุกต์จาก Dellarporta *et al.* (1983) (รายละเอียด ดูในภาคผนวก 1)

2. การพัฒนาเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์

แยกโคลนที่มีไมโครแซทเทลไลต์ ตามวิธีที่ประยุกต์จาก Yaish and Vega (2003) (รายละเอียด ดูในภาคผนวก 2) โดยมีวิธีการ ดังนี้

2.1 นำจีโนมิกดีเอ็นเอของกล้วยไม้สกุลแวนด้ามาตัดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ *MseI* แล้วเชื่อมต่อดีเอ็นเอที่ตัดโดยสมบูรณ์ เข้ากับ *MseI* adaptor จากนั้นเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธีพีซีอาร์ และตรวจสอบผล

2.2 นำผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้ มาทำไฮบริดเชนกับโอลิโกนิวคลีโอไทด์ที่ติดฉลากด้วยไบโอติน (Biotinylated oligo) ทางด้านปลาย 5' โดยแบ่งเป็น 2 กลุ่ม กลุ่มแรก เป็น dinucleotide repeat จำนวน 2 ชนิด คือ (CA)₁₅ และ (GA)₁₅ และกลุ่มที่สอง เป็น trinucleotide repeat 2 ชนิด คือ (CCT)₁₀ และ (ACC)₁₀

2.3 แยกชั้นดีเอ็นเอเป้าหมายออก โดยทำปฏิกิริยากับ streptavidin ที่เคลือบอยู่บน magnetic beads แล้วเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายด้วยวิธีพีซีอาร์

2.4 นำผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้มาเชื่อมต่อเข้ากับพลาสมิด pGEM[®]-T Vector (Promega, USA) และถ่ายพลาสมิดสายผสมเข้าสู่เซลล์แบคทีเรียด้วยวิธีทรานสฟอร์เมชัน

3. การคัดเลือกและตรวจสอบโคลนที่มีลำดับไมโครแซทเทลไลต์

3.1 คัดเลือกโคโลนีสีขาว โดยเขี่ยเชื้อใส่ลงในหลอดที่มีน้ำกลั่นนิ่งมาเชื้อปริมาตร 30 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วดูดสารละลายเซลล์ไปตรวจสอบชั้นดีเอ็นเอที่สอດแทรกอยู่ ด้วยวิธีพีซีอาร์

3.2 คัดเลือกเฉพาะโคลนที่มีดีเอ็นเอสอດแทรกอยู่ มาตรวจสอบดีเอ็นเอส่วนที่เป็นไมโครแซทเทลไลต์ด้วยเทคนิค dot blot hybridization โดยนำผลผลิตพีซีอาร์ของโคลนที่คัดเลือก มาหยดลงบนแผ่นเมมเบรน ทำการไฮบริไดเซชันกับโพรบที่มีลำดับไมโครแซทเทลไลต์ที่ติดฉลากด้วยไบโอติน

3.3 ตรวจสอบผลด้วยชุดตรวจสอบ North2South Chemiluminescent Hybridization and Detection Kit (Pierce Biotechnology, USA) (รายละเอียด ดูในภาคผนวก 3)

4. การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ และออกแบบไพรเมอร์

4.1 คัดเลือกโคลนที่ให้ผลบวกมาสกัดพลาสมิด ด้วยชุดน้ำยาสำเร็จรูป QIA prep® Spin Miniprep (QIAGEN, USA) แล้วส่งพลาสมิดไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์

4.2 วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ และออกแบบไพรเมอร์ให้ครอบคลุมไมโครแซทเทลไลต์ โดยไพรเมอร์แต่ละเส้นมีความยาว 19-23 เบส และคำนวณค่า T_m ของแต่ละคู่ไพรเมอร์ให้มีค่าใกล้เคียงกัน

4.3 คัดเลือกไพรเมอร์ โดยนำไพรเมอร์ที่ออกแบบได้ มาตรวจสอบกับจีโนมิกดีเอ็นเอของกล้วยไม้บางส่วน ด้วยวิธีพีซีอาร์ เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาที่ทำให้เกิดผลผลิตพีซีอาร์จำเพาะ โดยปฏิกิริยาประกอบด้วย สารละลายดีเอ็นเอ (50 ng/μl) 1.0 ไมโครลิตร ไพรเมอร์ forward (5 pmol/μl) 1 ไมโครลิตร ไพรเมอร์ reverse (5 pmol/μl) 1 ไมโครลิตร dNTP (2 mM) 1.5 ไมโครลิตร 10X PCR buffer 1.5 ไมโครลิตร Taq DNA polymerase (5 U/μl) 0.1 ไมโครลิตร และเติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตรรวม 15.0 ไมโครลิตร ปรับโปรแกรมการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ จนได้สภาวะที่เหมาะสมกับแต่ละคู่ไพรเมอร์

5. การตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์

5.1 นำไพรเมอร์ที่คัดเลือกได้ มาตรวจสอบกับตัวอย่างดีเอ็นเอของกล้วยไม้สกุลแวนด้าทั้ง 33 ตัวอย่าง โดยวิธีพีซีอาร์

5.2 ตรวจสอบผลผลิตพีซีอาร์ โดยการทำอิเล็กโทรโฟริซิสบนโพลีอะครีลาไมด์ ความเข้มข้น 6 เปอร์เซ็นต์ และย้อมด้วยซิลเวอร์ไนเตรท (รายละเอียด ดูในภาคผนวก 4)

6. การวิเคราะห์ข้อมูล

6.1 นำข้อมูลจีโนไทป์ของกล้วยไม้สกุลแวนด้าแต่ละชนิดมาคำนวณค่าต่างๆ ดังนี้

6.1.1 ค่าเฮเทอโรไซโกซิตีจากการสังเกต (observed heterozygosity, H_o) คำนวณได้จากอัตราส่วนระหว่างจำนวนตัวอย่างที่มีจีโนไทป์เป็นเฮเทอโรไซกัสต่อจำนวนตัวอย่างทั้งหมด

6.1.2 ค่าเฮเทอโรไซโกซิตีจากค่าคาดหวัง (expected heterozygosity, H_e) (Nei, 1978) คำนวณได้จากสูตร

$$H_e = 1 - \sum_{i=1}^k p_i^2$$

เมื่อค่า p_i เท่ากับความถี่ของแอลลีลที่ i ของเครื่องหมายที่ตำแหน่งหนึ่ง ($p_1 + p_2 + p_3 + \dots + p_k = 1$)

6.1.3 จำนวนแอลลีลที่มีประสิทธิภาพในการแยกความแตกต่าง (effective number of allele, n_e) (Kimura and Crow, 1964) คำนวณได้จากสูตร

$$n_e = \frac{1}{\sum_{i=1}^k p_i^2}$$

6.1.4 ค่าความน่าจะเป็นที่ตัวอย่าง 2 ตัวอย่าง ที่สุ่มเลือกมาจะมีจีโนไทป์เหมือนกัน (probability of identity, PI) (Kaul *et al.*, 2001) คำนวณได้จากสูตร

$$PI = \sum_{i=1}^k (p_i^2)^2 + \sum_{i=1}^k \sum_{j=i+1}^k (2p_i p_j)^2$$

6.2 วิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม โดยแปลผลข้อมูลจากแถบดีเอ็นเอให้เป็นแบบไบนารี (binary) พันธุ์ที่พบแถบดีเอ็นเอที่ตำแหน่งหนึ่งๆ ให้ค่าเป็น “1” ส่วนพันธุ์ที่ไม่พบแถบดีเอ็นเอที่ตำแหน่งเดียวกันนั้น ให้ค่าเป็น “0” และคำนวณค่าความเหมือนทางพันธุกรรมด้วยวิธี simple matching (Sneath and Sokal, 1973) โดยใช้โปรแกรม NTSYS-pc version 2.1m (Rohlf, 2000) และแสดงผลในรูปของ dendrogram

ผลและวิจารณ์

1. การพัฒนาเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์

สกัดดีเอ็นเอจากกล้วยไม้แวนด้าพันธุ์ต่างๆ แล้วเลือกกล้วยไม้แวนด้ามา 1 ชนิด คือ พันธุ์ Robert's Delight เพื่อนำมาพัฒนาเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ โดยนำดีเอ็นเอของกล้วยไม้พันธุ์ดังกล่าวไปตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *MseI* พบว่าแถบดีเอ็นเอที่มีลักษณะ smear แสดงให้เห็นว่าดีเอ็นเอถูกตัดโดยสมบูรณ์ จึงนำมาต่อเข้ากับ *MseI* adaptor และเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธีพีซีอาร์ จากนั้นคัดเลือกชิ้นดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสแบบไมโครแซทเทลไลต์ ด้วยการไฮบริดซ์กับโอลิโกนิวคลีโอไทด์โพรบ 2 กลุ่ม คือ กลุ่มแรกเป็น dinucleotide repeat 2 ชนิด คือ $(CA)_{15}$ และ $(GA)_{15}$ กลุ่มที่สอง เป็น trinucleotide repeat 2 ชนิด คือ $(ACC)_{10}$ และ $(CCT)_{10}$ โดยโพรบแต่ละชนิดจะติดฉลากที่ปลาย 5' ด้วยไบโอติน (Biotinylated oligo) จึงสามารถแยกชิ้นดีเอ็นเอที่เกาะกับโพรบได้เมื่อทำปฏิกิริยากับ streptavidin ที่เคลือบบน magnetic beads เมื่อได้ดีเอ็นเอเป้าหมายแล้ว นำมาเพิ่มปริมาณและทำให้เป็นสายคู่ ด้วยวิธีพีซีอาร์ จากนั้นเชื่อมต่อดีเอ็นเอเป้าหมายเข้ากับพลาสติก แล้วถ่ายเข้าสู่เซลล์แบคทีเรียด้วยวิธีทรานสฟอร์มเมชัน พบว่าได้โคลนจากห้องสมุดจีโนมที่ใช้ dinucleotide repeat เป็นโพรบ จำนวน 429 โคลน คัดเลือกโคลนที่มีชิ้นดีเอ็นเอแทรกอยู่ด้วยวิธีพีซีอาร์ ได้จำนวน 342 โคลน จากนั้นตรวจสอบโคลนที่มีลำดับเบสแบบไมโครแซทเทลไลต์ด้วยวิธี dot blot hybridization พบว่าได้โคลนที่ให้ผลบวก 282 โคลน (ตารางที่ 1) คิดเป็น 82.45 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเป็นค่าที่สูง นับว่าการพัฒนาเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์แบบ enrichment มีประสิทธิภาพพลีได้เปอร์เซ็นต์โคลนที่เป็นไมโครแซทเทลไลต์สูงเมื่อเทียบกับวิธีสร้างห้องสมุดจีโนมแบบเดิมซึ่งได้ผลไม่ถึง 1 เปอร์เซ็นต์ (Tang *et al.*, 2003)

สำหรับห้องสมุดจีโนมที่ใช้ trinucleotide repeat เป็นโพรบ พบว่าได้โคลนทั้งหมด 340 โคลน และคัดเลือกโคลนที่มีชิ้นดีเอ็นเอแทรกอยู่ด้วยวิธีพีซีอาร์ ได้จำนวน 323 โคลน แต่เมื่อนำโคลนที่ได้มาตรวจสอบด้วยวิธี dot blot hybridization พบว่าได้โคลนที่ให้ผลบวกเพียง 32 โคลน (ตารางที่ 1) คิดเป็น 9.91 เปอร์เซ็นต์ นับว่าน้อยมาก ทั้งนี้เนื่องจากไมโครแซทเทลไลต์ดีเอ็นเอแบบ trinucleotide repeat ในกล้วยไม้ มีขนาดสั้น ทำให้จับกับโพรบได้ไม่ดี ดังนั้นโพรบอาจหลุดออกในขั้นตอนการล้างโพรบ หรือโพรบที่ใช้ไม่เหมาะสม หรืออาจเป็นเพราะไมโครแซทเทลไลต์ในกล้วยไม้แวนด้าส่วนใหญ่ เป็นแบบ dinucleotide repeat โพรบแบบ trinucleotide repeat จึงเข้าไปจับกับดีเอ็นเอเป้าหมายได้ยาก ทำให้ได้ดีเอ็นเอเป้าหมายน้อย ซึ่งสอดคล้องกับรายงานในพืช

ส่วนใหญ่ที่พบลำดับเบสซ้ำแบบ dinucleotide repeat มากกว่าลำดับเบสซ้ำแบบอื่นๆ (Wang *et al.*, 1994)

ตารางที่ 1 จำนวน โคลนที่ได้จากการพัฒนาเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ชั้นต่างๆ จากห้องสมุดจีโนมที่ใช้โพรบแบบ dinucleotide และ trinucleotide repeat

ขั้นตอนการพัฒนาเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์	ห้องสมุดจีโนมที่ใช้โพรบแบบ	
	dinucleotide repeat	trinucleotide repeat
1. จำนวน โคลนที่ได้จากการทรานสฟอร์มชัน	429	340
2. จำนวน โคลนที่คัดเลือกได้จากการตรวจสอบด้วยวิธีพีซีอาร์	342	323
3. จำนวน โคลนที่ให้ผลบวกจากการตรวจสอบด้วยวิธี dot blot hybridization	282	32
4. จำนวน โคลนที่ส่งหาลำดับเบส	278	30
5. จำนวน โพรเมอร์ที่ออกแบบได้	56	0

จากนั้นนำโคลนที่ให้ผลบวกจากการทำ dot blot hybridization จำนวน 308 โคลน (จากห้องสมุดจีโนมที่ใช้ dinucleotide repeat เป็นโพรบ จำนวน 278 โคลน และจากห้องสมุดจีโนมที่ใช้ trinucleotide repeat เป็นโพรบ จำนวน 30 โคลน) มาสกัดพลาสมิดให้บริสุทธิ์ และส่งหาลำดับเบสพบว่าลำดับเบสที่ได้สามารถจำแนกออกเป็น 4 กลุ่ม (ตารางที่ 2) ดังนี้

1. ลำดับเบสที่มีซันดิเอ็นเอสอดแทรกสมบูรณ์ และมีลำดับเบสแบบไมโครแซทเทลไลต์อยู่ตรงกลาง
2. ลำดับเบสที่มีซันดิเอ็นเอสอดแทรกสมบูรณ์ และมีลำดับเบสแบบไมโครแซทเทลไลต์อยู่บริเวณส่วนต้น หรือส่วนปลาย
3. ลำดับเบสที่มีซันดิเอ็นเอสอดแทรกสมบูรณ์ แต่ไม่มีลำดับเบสแบบไมโครแซทเทลไลต์
4. ลำดับเบสไม่สมบูรณ์ โดยมีความบกพร่องจากการอ่านลำดับเบส

ตารางที่ 2 จำนวนลำดับเบสแต่ละประเภทที่พบในการพัฒนาเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์จาก
ห้องสมุดจีโนมที่ใช้โพรบแบบ dinucleotide repeat และ trinucleotide repeat

ประเภทของลำดับเบส	ห้องสมุดจีโนมที่ใช้โพรบแบบ	
	dinucleotide repeat	trinucleotide repeat
1. ลำดับเบสที่มีซันดิเอ็นเอสอดแทรกสมบูรณ์ (กลุ่ม 1)	121	2
2. ลำดับเบสที่มีไมโครแซทเทลไลต์อยู่บริเวณส่วน ต้น หรือส่วนปลาย (กลุ่ม 2)	114	22
3. ลำดับเบสที่ไม่มีไมโครแซทเทลไลต์ (กลุ่ม 3)	9	3
4. ลำดับเบสไม่สมบูรณ์ (กลุ่ม 4)	34	3
รวม	278	30

จากลำดับเบสที่ได้ พบว่ามีเฉพาะลำดับเบสกลุ่มที่ 1 เท่านั้น ที่สามารถนำมาออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะได้ สำหรับลำดับเบสกลุ่มที่ 2 นำมาออกแบบไพรเมอร์ไม่ได้ เนื่องจากลำดับเบสที่ ขนาบข้างลำดับเบสแบบไมโครแซทเทลไลต์บริเวณ 5' หรือ 3' มีขนาดสั้นเกินไป (น้อยกว่า 10 คู่ เบส) หรือไม่มีเลย ทั้งนี้เนื่องจากเอนไซม์ตัดจำเพาะที่นำมาใช้ไม่เหมาะสม โดยพบว่าลำดับเบส บริเวณขนาบข้างของไมโครแซทเทลไลต์จำนวนมาก เป็นบริเวณที่มีเบส A และ T เป็น องค์ประกอบส่วนใหญ่ (AT rich) และเอนไซม์ตัดจำเพาะ *MseI* ที่ใช้นั้น มีบริเวณจดจำเป็น 5' T↓TAA 3' จึงทำให้บริเวณที่ขนาบข้างของไมโครแซทเทลไลต์ถูกตัดออกไป ส่วนลำดับเบสกลุ่ม ที่ 3 ซึ่งไม่มีลำดับเบสแบบไมโครแซทเทลไลต์ แต่ก็พบว่ามีลำดับเบสบางส่วนที่มีลักษณะคล้ายคลึง กับลำดับเบสแบบไมโครแซทเทลไลต์ ดังนั้นโพรบอาจเข้าจับคู่ผิดก็ได้ สำหรับลำดับเบสกลุ่มที่ 4 พบว่ามีลำดับเบสไม่สมบูรณ์ อาจเกิดจากความผิดพลาดขณะทำการหาลำดับเบส หรืออาจเกิดจาก การปนเปื้อนของพลาสมิมากกว่า 1 ชนิด ทำให้เครื่องไม่สามารถอ่านผลได้

นำโคลนทั้งหมดที่มีลำดับเบสแบบไมโครแซทเทลไลต์มาจำแนกเป็นกลุ่ม คือ dinucleotide repeat, trinucleotide repeat และ compound repeat ได้ดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ลำดับเบสแบบไมโครแซทเทลไลต์ชนิดต่างๆ ที่พบในการพัฒนาเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์

ชนิดของไมโครแซทเทลไลต์	จำนวนโคลนที่ได้	เปอร์เซ็นต์
Dinucleotide repeat		
(CA) _n	43	15.93
(GA) _n	61	22.59
Trinucleotide repeat		
(CCT) _n	25	9.26
(ACC) _n	2	0.74
Compound repeat		
(CA) _n (TA) _n	3	1.11
(GA) _n (CA) _n	2	0.74
(GA) _n (GT) _n	122	45.19
(GA) _n (TA) _n	1	0.37
(CA) _n (CT) _n (GT) _n	1	0.37
(CA) _n (TA) _n (CA) _n	1	0.37
(GA) _n (GT) _n (TA) _n	4	1.48
(GA) _n (GT) _n (CT) _n	4	1.48
(GA) _n (GT) _n (GA) _n	1	0.37
รวม	270	100

หมายเหตุ จำนวนโคลนที่ได้ทั้งหมด ได้รวมโคลนที่มีลำดับเบสไม่สมบูรณ์ แต่มีลำดับไมโครแซทเทลไลต์อยู่ภายในจำนวน 11 โคลนด้วย

จากตารางจะเห็นว่าลำดับเบสแบบไมโครแซทเทลไลต์ชนิดซ้ำ 2 เบส (dinucleotide repeats) ที่พบส่วนใหญ่ เป็นแบบ (GA)_n คิดเป็น 22.59 เปอร์เซ็นต์ และรองลงมาคือ (CA)_n คิดเป็น 15.93 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานในพืชหลายชนิด เช่น ถั่วลิสง (He *et al.*, 2003) อะโวคาโด (Ashworth *et al.*, 2004) เป็นต้น นอกจากนี้ Wang *et al.* (1994) ได้สำรวจลำดับเบสซ้ำแบบต่างๆ ในพืช และพบว่าพืชส่วนใหญ่ก็มีลำดับเบสซ้ำแบบ (AT)_n รองลงมาคือ (GA)_n และ (CA)_n ตามลำดับ แต่ในงานวิจัยครั้งนี้ ไม่พบลำดับเบสซ้ำแบบ (AT)_n เนื่องจากไม่ได้ออกแบบไพรเมอร์ที่มีลำดับเบสดังกล่าว เนื่องจากโอลิโกนิวคลีโอไทด์ชนิด (AT)_n จะจับกันเอง สำหรับไมโครแซทเทลไลต์ชนิดซ้ำ 3 เบส (trinucleotide repeats) นั้น เป็นแบบ (CCT)_n 9.26 เปอร์เซ็นต์ และแบบ (ACC)_n

0.74 เปอร์เซ็นต์ และพบไมโครแซทเทลไลต์ชนิด compound repeat แบบ (GA)_n(GT)_n มากที่สุด โดยคิดเป็น 45.19 เปอร์เซ็นต์

นำลำดับเบสที่มีลักษณะดังกลุ่ม 1 คือ ลำดับเบสที่มีซันดิเอ็นเอสอดแทรกสมบูรณ์ โดยมี ลำดับเบสแบบไมโครแซทเทลไลต์อยู่ตรงกลางมาวิเคราะห์ เพื่อออกแบบไพรเมอร์ และคัดเลือก โคลนที่มีลำดับเบสแบบไมโครแซทเทลไลต์อยู่บริเวณส่วนปลาย โดยยังอ่านลำดับเบสได้ไม่ สมบูรณ์ ไปหาลำดับเบสจากด้าน 3' (reverse) เพื่อให้ได้ลำดับเบสจากส่วนหลังย้อนขึ้นมา จึงจะ สามารถออกแบบไพรเมอร์ได้ จากนั้นทำการออกแบบไพรเมอร์ โดยแต่ละลำดับเบสจะออกแบบ ไพรเมอร์ 2 สาย คือ สาย forward primer (F) และสาย reverse primer (R) โดยให้ครอบคลุมส่วนไมโคร แซทเทลไลต์ ไพรเมอร์ที่ออกแบบควรมีความยาวประมาณ 18-30 เบส และต้องไม่มีลำดับเบสที่เข้า คู่กันเอง มีค่าอุณหภูมิหลอมตัว (T_m , melting temperature) ใกล้เคียงกัน ซึ่งคำนวณค่าโดยประมาณ ได้จากสูตร T_m (องศาเซลเซียส) = $2(A+T)+4(G+C)$ โดย A, T C และ G คือ จำนวนเบสแต่ละชนิดที่ มีในไพรเมอร์นั้น (สุรินทร์, 2545) และมีขนาดของผลผลิตพีซีอาร์ประมาณ 100-350 คู่เบส

จากการวิเคราะห์ลำดับเบส เพื่อออกแบบไพรเมอร์พบว่าไม่มีลำดับเบสใดที่ซ้ำกันเลย โดย สามารถออกแบบไพรเมอร์จากห้องสมุดจีโนมที่ใช้ dinucleotide repeat เป็นโพรบ ได้ทั้งหมด 56 คู่ และไม่สามารถออกแบบไพรเมอร์จากห้องสมุดจีโนมที่ใช้ trinucleotide repeat เป็นโพรบ โดย พบว่ามีลำดับเบสจำนวนมากไม่สามารถนำมาใช้ออกแบบไพรเมอร์ได้ เนื่องจากส่วนไมโครแซท เทลไลต์อยู่ที่ปลายของซันดิเอ็นเอ หรือลำดับเบสที่อยู่ข้างเคียงไม่เหมาะสมในการออกแบบไพร เมอร์ เช่นเป็น AT rich หรือสามารถจับกันเองได้ เป็นต้น นอกจากนี้ยังพบว่าลำดับเบสแบบไมโคร แซทเทลไลต์ในบางโคลนมีขนาดยาวมาก จนทำให้เครื่องไม่สามารถอ่านลำดับเบสได้ทั้งหมด ถึงแม้จะหาลำดับเบสแบบย้อนกลับ (reverse) แล้วก็ตาม จึงทำให้ไม่ทราบขนาดของผลผลิตพีซีอาร์ ที่แท้จริง จากนั้นนำไพรเมอร์ที่ออกแบบทั้งหมด มาทดสอบกับ genomic DNA ของกล้วยไม้จำนวน 14 ตัวอย่าง ด้วยวิธีพีซีอาร์ เพื่อเพิ่มปริมาณส่วนที่เป็นไมโครแซทเทลไลต์ดีเอ็นเอ และพบว่าไพร เมอร์หลายคู่เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากตัวอย่างแล้วมีลักษณะผลแบบส่ม เกิดแถบดีเอ็นเอจำนวนมาก ไพรเมอร์บางคู่ไม่ให้ผลผลิตดีเอ็นเอตามขนาดที่คาดหวัง จึงต้องปรับสภาวะของการทำพีซีอาร์ โดยการปรับอุณหภูมิที่ใช้ในขั้น annealing และปรับปริมาณ $MgCl_2$ เพื่อให้ได้ผลผลิตพีซีอาร์ที่ จำเพาะ หลังจากปรับสภาวะแล้วพบไพรเมอร์ที่มีศักยภาพ สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ขนาด ตามที่คาดหวัง และให้ความแตกต่างของขนาดดีเอ็นเอระหว่างกล้วยไม้ที่ใช้ตรวจสอบจำนวน 7 คู่ (ตารางที่ 4) คือ C32, C106, C208, C225, C268, C359, C364 และได้นำไพรเมอร์ซึ่งพัฒนามาจาก จีโนมของกล้วยไม้มอคคาร่าอีก 2 คู่ คือ MOK26 และ MOK29 มาใช้ด้วย สาเหตุที่ไพรเมอร์จำนวน

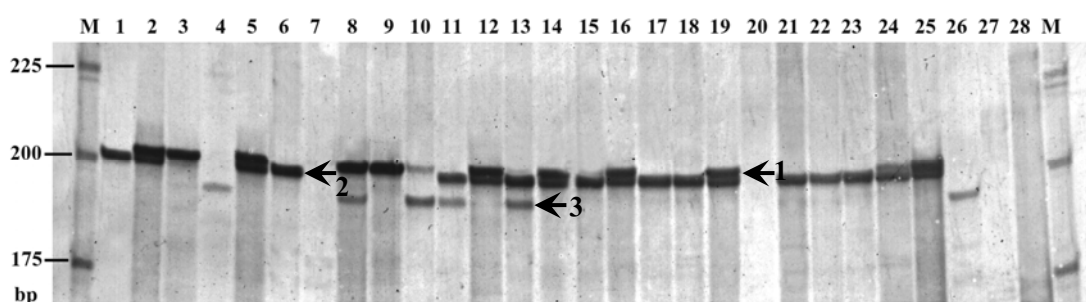
มากไม่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในตำแหน่งที่ต้องการ หรือให้แถบดีเอ็นเอจำนวนมาก อาจเนื่องจากสภาวะในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ไม่เหมาะสม หรือไพรเมอร์ที่ออกแบบ ไม่มีความจำเพาะเจาะจงกับตำแหน่งที่ต้องการ นอกจากนี้ยังพบว่ามีไพรเมอร์อีกหลายคู่ เช่น C202 ให้แถบดีเอ็นเอค่อนข้างเหมือนกัน มีความแตกต่างระหว่างตัวอย่างกล้วยไม้ที่ใช้ตรวจสอบน้อย หรือไม่มีความแตกต่างเลย จึงไม่ได้นำมาใช้

ตารางที่ 4 ลำดับเบสของไพรเมอร์ ชนิดของลำดับเบสซ้ำที่อยู่ในระหว่างคู่ไพรเมอร์ และค่า T_m ของไพรเมอร์ทั้ง 9 คู่

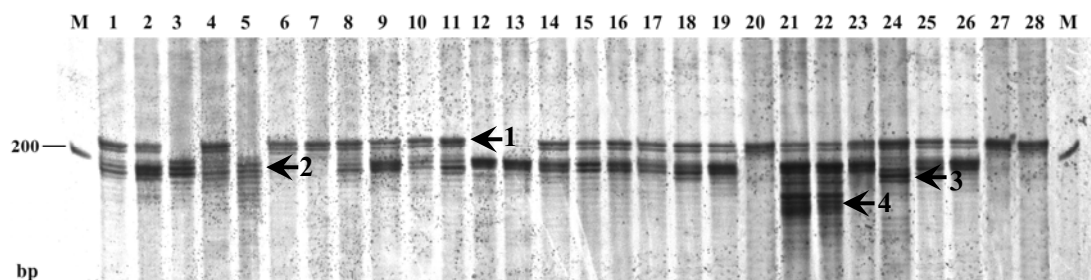
No.	คู่ไพรเมอร์	ลำดับเบส (5'-3')	ลำดับเบสซ้ำ	T_m (°C)
1.	C32	F: AAT GGA CCT TCT TTG CAT TAC R: ATT ACC GTT CAT TTC TGG TGC	(GA) ₂₆ (GT) ₄₀	46
2.	C106	F: AAG TCT AGC TTT TGG TTG AGG R: ATC GAT GGT TTG TTC TTC TAG C	(GA) ₂₅ (GT) ₄₅ (TA) ₅	44
3.	C208	F: TCA TTG ATG TTG GGA GCC TAA R: CTT GCC CTC TAT CTT TCT CTT	(GA) ₁₁ (GT) ₄₂ (TA) ₃	50
4.	C225	F: AGA ACT AGA TGA CTT CAA AAC G R: GAA CTC AGA AAA ATT ACC GCG	(GA) ₂₄ (GT) ₆	47
5.	C268	F: TGG AAA TGC ATG TTG CCC GA R: ACT GAG TGA CCT TGG AAG AC	(GA) ₃₉ (GT) ₁₈	46
6.	C359	F: CTT TGA GTA ATG TCT CTC AGT G R: CCC TCA CGC ACT CTC TAC C	(GA) ₁₆ (GT) ₁₅	45
7.	C364	F: AGC ATT ATA GAA CTA GAT GAC R: GAA TAC TCA AGC TAT GCA TC	(CA) ₂₁	44
8.	MOK26	F: AGA ATG AGG GAG GTA TAG GG R: TGC CTT GGA TGT GCG TTC G	(CCT) ₁₇	52
9.	MOK29	F: TTC AGC GTT TCC ATG TCG AAG R: AGT AAA GCC GCC ATC TTG G	(GA) ₁₃	52

2. การตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอ

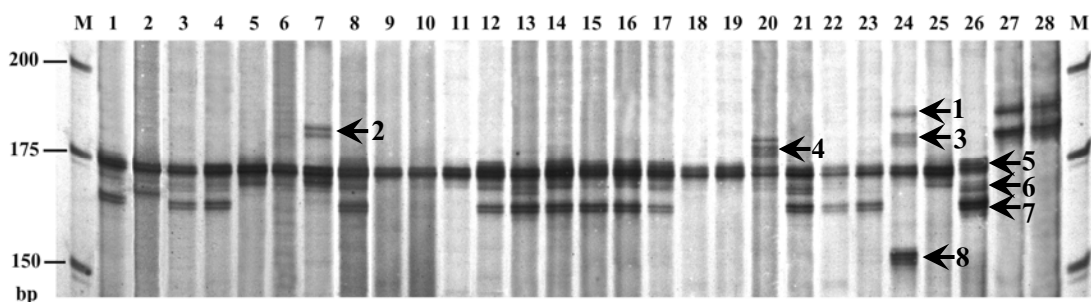
นำไพรเมอร์ที่คัดเลือกได้ทั้ง 9 คู่ มาตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอของกล้วยไม้สกุลแวนด้า จำนวน 28 ตัวอย่าง และตัวอย่างที่เป็นพันธุ์พ่อ พันธุ์แม่ และลูกผสม จำนวน 2 ชุด (5 ตัวอย่าง) รวมเป็น 33 ตัวอย่าง จากผลการตรวจสอบพบว่าไพรเมอร์ C32 มีจำนวนแอลลีล 3 แอลลีล (ภาพที่ 1) ไพรเมอร์ C106 มีจำนวนแอลลีล 4 แอลลีล (ภาพที่ 2) ไพรเมอร์ C208 มีจำนวนแอลลีล 8 แอลลีล (ภาพที่ 3) ไพรเมอร์ C225 มีจำนวนแอลลีล 9 แอลลีล (ภาพที่ 4) ไพรเมอร์ C268 มีจำนวนแอลลีล 5 แอลลีล (ภาพที่ 5) ไพรเมอร์ C359 มีจำนวนแอลลีล 6 แอลลีล (ภาพที่ 6) ไพรเมอร์ C364 มีจำนวนแอลลีล 6 แอลลีล (ภาพที่ 7) ไพรเมอร์ MOK26 มีจำนวนแอลลีล 8 แอลลีล (ภาพที่ 8) และไพรเมอร์ MOK29 มีจำนวนแอลลีล 5 แอลลีล (ภาพที่ 9) สำหรับไพรเมอร์ C202 นั้น มีเพียง 2 แอลลีล (ภาพที่ 10) ซึ่งไม่เหมาะสมในการนำมาใช้แยกความแตกต่างระหว่างตัวอย่างกล้วยไม้แต่ละชนิด เนื่องจากมีโพลิเมอร์พีซิมที่ตำแหน่งดังกล่าวน้อย จึงไม่นำไพรเมอร์ C202 มาวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่างตัวอย่างกล้วยไม้ต่างๆ



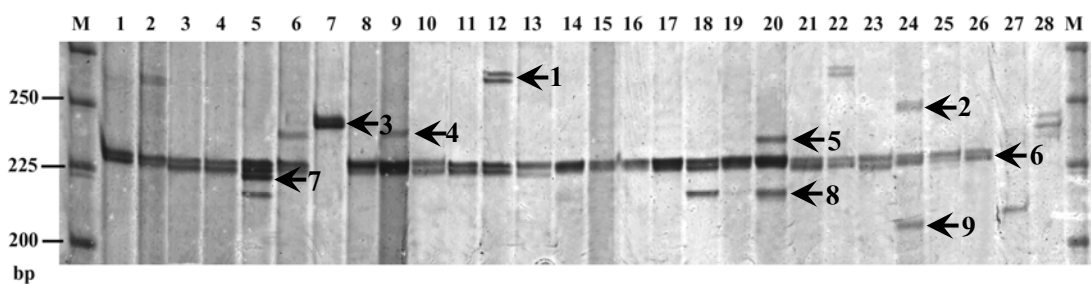
ภาพที่ 1 ผลการตรวจสอบดีเอ็นเอของกล้วยไม้ด้วยคู่ไพรเมอร์ C32 พบแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 193-204 คู่เบส จำนวน 3 แอลลีล (M คือ แถบดีเอ็นเอมาตรฐาน 1-28 คือ ตัวอย่างกล้วยไม้สกุลแวนด้าตัวอย่างที่ 1-28 ตามหน้าที่ 17)



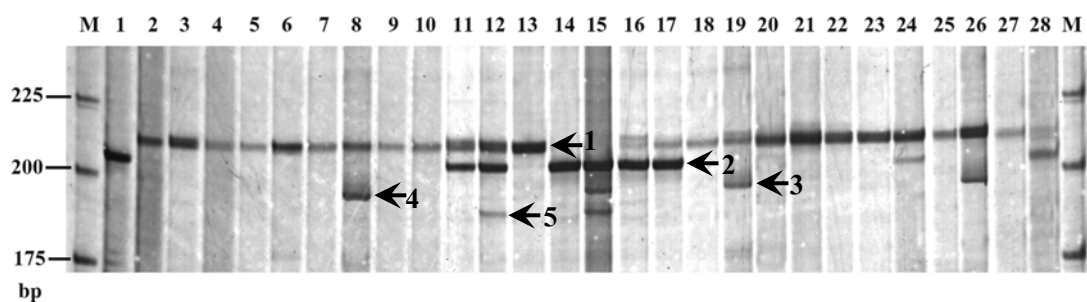
ภาพที่ 2 ผลการตรวจสอบดีเอ็นเอของกล้วยไม้ด้วยคู่ไพรมเมอร์ C106 พบแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 193-205 คู่เบส จำนวน 4 แอลลีล (M คือ แถบดีเอ็นเอมาตรฐาน 1-28 คือ ตัวอย่างกล้วยไม้สกุลแวนด้าตัวอย่างที่ 1-28 ตามหน้าที่ 17)



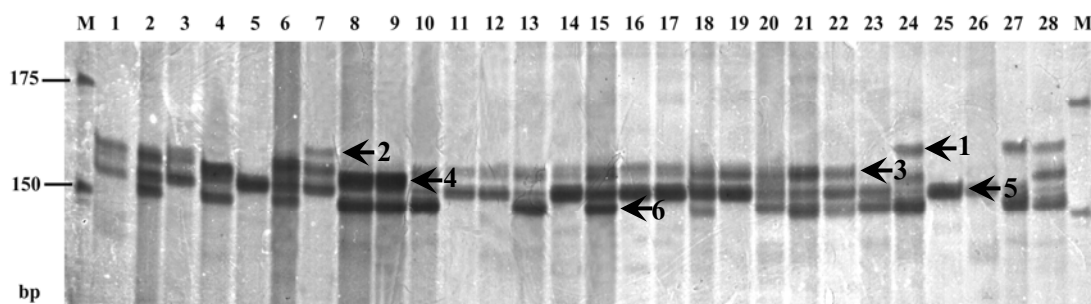
ภาพที่ 3 ผลการตรวจสอบดีเอ็นเอของกล้วยไม้ด้วยคู่ไพรมเมอร์ C208 พบแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 153-190 คู่เบส จำนวน 8 แอลลีล (M คือ แถบดีเอ็นเอมาตรฐาน 1-28 คือ ตัวอย่างกล้วยไม้สกุลแวนด้าตัวอย่างที่ 1-28 ตามหน้าที่ 17)



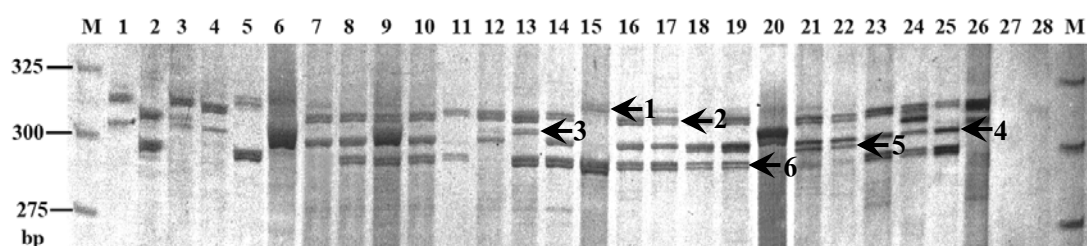
ภาพที่ 4 ผลการตรวจสอบดีเอ็นเอของกล้วยไม้ด้วยคู่ไพรมเมอร์ C225 พบแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 206-263 คู่เบส จำนวน 9 แอลลีล (M คือ แถบดีเอ็นเอมาตรฐาน 1-28 คือ ตัวอย่างกล้วยไม้สกุลแวนด้าตัวอย่างที่ 1-28 ตามหน้าที่ 17)



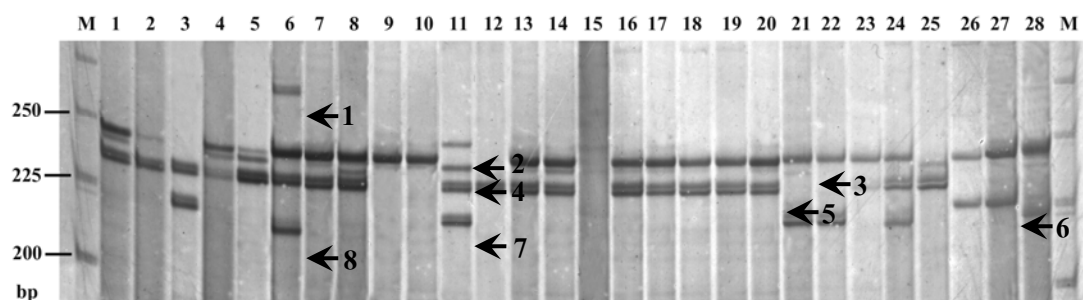
ภาพที่ 5 ผลการตรวจสอบดีเอ็นเอของกล้วยไม้ด้วยคู่ไพรเมอร์ C268 พบแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 187-212 คู่เบส จำนวน 5 แอลลีล (M คือ แถบดีเอ็นเอมาตรฐาน 1-28 คือ ตัวอย่างกล้วยไม้สกุลแวนด้าตัวอย่างที่ 1-28 ตามหน้าที่ 17)



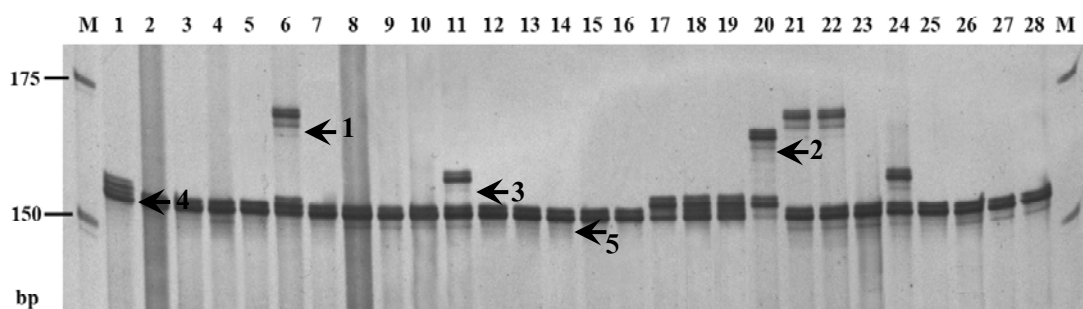
ภาพที่ 6 ผลการตรวจสอบดีเอ็นเอของกล้วยไม้ด้วยคู่ไพรเมอร์ C359 พบแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 152-167 คู่เบส จำนวน 6 แอลลีล (M คือ แถบดีเอ็นเอมาตรฐาน 1-28 คือ ตัวอย่างกล้วยไม้สกุลแวนด้าตัวอย่างที่ 1-28 ตามหน้าที่ 17)



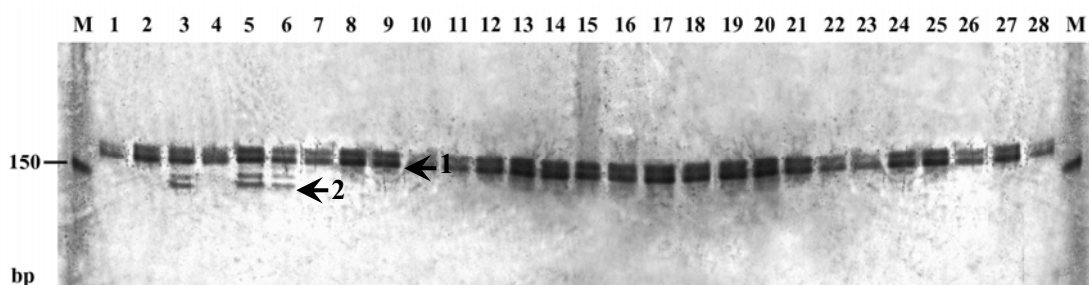
ภาพที่ 7 ผลการตรวจสอบดีเอ็นเอของกล้วยไม้ด้วยคู่ไพรเมอร์ C364 พบแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 296-316 คู่เบส จำนวน 6 แอลลีล (M คือ แถบดีเอ็นเอมาตรฐาน 1-28 คือ ตัวอย่างกล้วยไม้สกุลแวนด้าตัวอย่างที่ 1-28 ตามหน้าที่ 17)



ภาพที่ 8 ผลการตรวจสอบดีเอ็นเอของกล้วยไม้ด้วยคู่ไพรเมอร์ MOK26 พบแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 212-272 คู่เบส จำนวน 8 แอลลีล (M คือ แถบดีเอ็นเอมาตรฐาน 1-28 คือ ตัวอย่างกล้วยไม้สกุลแวนด้าตัวอย่างที่ 1-28 ตามหน้าที่ 17)



ภาพที่ 9 ผลการตรวจสอบดีเอ็นเอของกล้วยไม้ด้วยคู่ไพรเมอร์ MOK29 พบแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 155-175 คู่เบส จำนวน 5 แอลลีล (M คือ แถบดีเอ็นเอมาตรฐาน 1-28 คือ ตัวอย่างกล้วยไม้สกุลแวนด้าตัวอย่างที่ 1-28 ตามหน้าที่ 17)



ภาพที่ 10 ผลการตรวจสอบดีเอ็นเอของกล้วยไม้ด้วยคู่ไพรเมอร์ C202 พบแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 149-155 คู่เบส จำนวน 2 แอลลีล (M คือ แถบดีเอ็นเอมาตรฐาน 1-28 คือ ตัวอย่างกล้วยไม้สกุลแวนด้าตัวอย่างที่ 1-28 ตามหน้าที่ 17)

ตารางที่ 5 จีโนไทป์ของกล้วยไม้ทั้ง 33 ตัวอย่างจากการตรวจสอบโดยใช้ไพรเมอร์ 9 คู่

ตัวอย่างที่	C32	C106	C208	C225	C268	C359	C364	MOK26	MOK29
1	2,2	1,2	5,7	6,6	2,2	3,5	2,4	3,4,5	4,5
2	1,2	1,2	5,6	1,6	1,1	3,5,6	3,6	3,5	5,5
3	1,1	2,2	5,7	6,6	1,1	3,5	2,4	5,7	5,5
4	3,3	1,2	5,7	6,6	1,1	4,6	2,4	3,4,5	5,5
5	1,2	2,2	5,5	6,7,8	1,1	5,5	1,6	3,4,5	5,5
6	2,2	1,1	5,5	4,6	1,1	3,5,6	4,4	1,3,5,8	1,4,5
7	-	1,1	2,5	3,3	1,1	2,3,5	2,4	3,5	5,5
8	1,3	1,2	5,7	6,6	1,4	4,6	2,4,6	3,5	5,5
9	1,1	1,2	5,5	4,6	1,1	4,6	2,4,6	3,3	5,5
10	1,3	1,2	5,5	6,6	1,1	3,5,6	2,4,6	3,3	5,5
11	2,3	1,2	5,5	6,6	1,2	3,5	2,6	2,4,5,7	3,5
12	1,2	2,2	5,7	1,6	1,2	3,5	2,4	5,5	5,5
13	2,3	2,2	5,7	6,6	1,1	3,5,6	2,3,6	3,5	5,5
14	1,2	1,2	5,7	6,6	2,2	3,5	2,4,6	3,4,5	5,5
15	2,2	1,2	5,7	6,6	2,3,5	3,5,6	1,6	3,5	5,5
16	1,2	1,2	5,7	6,6	1,2	3,5	2,4,6	3,5	5,5
17	2,2	1,2	5,7	6,6	1,2	3,5	2,4,6	3,5	4,5
18	2,2	1,2	5,5	6,8	1,1	3,5,6	2,4,6	3,5	4,5
19	1,2	1,2	5,5	6,6	1,3	3,5	2,4,6	3,5	4,5
20	-	1,1	4,5	5,6,8	1,1	3,5,6	3,3	3,5	2,4
21	2,2	1,2,4	5,6,7	6,6	1,1	3,5,6	2,4,5,6	3,7	1,5
22	2,2	1,2,4	5,7	1,6	1,1	3,5,6	2,4,5	3,7	1,5
23	2,2	1,2	5,7	6,6	1,1	5,6	2,4,6	3,5	5,5
24	1,2	1,3	1,3,5,8	2,6,9	1,2	1,4,6	2,3,4,6	3,5,7	3,5
25	1,2	1,2	5,5	6,6	1,1	5,5	2,4,6	4,5	5,5
26	3,3	1,2	5,6,7	6,6	1,3	5,5	2,3	3,6	5,5
27	-	1,1	1,3	9,9	1,1	1,5,6	-	3,6	5,5
28	-	1,1	1,3	3,4	1,2	1,4,6	-	3,7	5,5
29	2,3	1,1	5,7	6,6	2,4	4,5	2,4	3,5	5,5
30	2,2	2,2	5,7	6,6	1,3,5	6,6	2,4,6	3,4	5,5
31	2,3	1,2	5,7	6,6	1,2,3,4,5	5,6	2,4,6	3,3	5,5

ตารางที่ 5 (ต่อ)

ตัวอย่างที่	C32	C106	C208	C225	C268	C359	C364	MOK26	MOK29
32	2,2	1,1	5,5	2,2	1,1	1,3,6	2,3,6	3,5	5,5
33	2,2	1,2	5,7	6,6	2,4	4,5	2,3,4,6	3,3	5,5

การตรวจสอบดีเอ็นเอของกล้วยไม้สกุลแวนด้าทั้ง 33 ตัวอย่าง ด้วยไพรเมอร์ 9 คู่ พบว่ามีจำนวนแอลลีลตั้งแต่ 3-9 แอลลีล โดยไพรเมอร์ C32 ให้จำนวนแอลลีลน้อยที่สุด และไพรเมอร์ C225 ให้จำนวนแอลลีลมากที่สุด โดยมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 6 แอลลีลต่อคู่ไพรเมอร์ และพบว่าไพรเมอร์ C106, C208, C225, C268, C359, MOK 26 และ MOK29 สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของกล้วยไม้ได้ทุกตัวอย่าง และให้ความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอ (แอลลีล) โดยขนาดของแอลลีลที่แตกต่างกัน นั้น อาจมีสาเหตุจากการขาดหายไปของลำดับเบสซ้ำ (deletion) หรือการเพิ่มขึ้นของลำดับเบสซ้ำ (insertion) แบบไมโครแซทเทลไลต์ โดยมีกลไก 2 แบบ คือ การเลื่อนของสายดีเอ็นเอที่จับคู่กัน ขณะเกิดการจำลองโมเลกุล (Slip-strand mispairing) หรือที่เรียกว่าเกิด slippage (Levinson and Gutman, 1987) และการแลกเปลี่ยนชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ไม่เท่ากัน (unequal crossing over) (Richard and Pâques, 2000) ทำให้มีการเปลี่ยนแปลงความยาวของลำดับเบสซ้ำ ก่อให้เกิดโพลิมอร์ฟิซึมของเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์นั่นเอง

นอกจากนี้พบว่าในคู่ไพรเมอร์ C32 เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของกล้วยไม้ได้ไม่ครบทุกตัวอย่าง ทั้งนี้อาจเกิดจาก null allele ซึ่งมีสาเหตุจากการขาดหายไปของไมโครแซทเทลไลต์ที่ตำแหน่งนั้นๆ (Callen *et al.*, 1993) หรือเกิดการกลายบริเวณตำแหน่งที่ไพรเมอร์เข้าไปจับ (Lehman *et al.*, 1996) จึงไม่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในตำแหน่งดังกล่าวได้ สำหรับไพรเมอร์ C32 และ C364 พบว่าไม่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของกล้วยไม้ *Vanda teres* และ *Vanda Miss Joaquim* ซึ่งเป็นแวนด้าใบกลม อาจเป็นเพราะแวนด้าใบกลมมีความแตกต่างทางพันธุกรรมจากแวนด้าตัวอย่างอื่นๆ ซึ่งเป็นแวนด้าใบแบน

เมื่อนำผลการตรวจสอบดีเอ็นเอของกล้วยไม้ทั้งหมด มาคำนวณค่า observed heterozygosity (H_o), expected heterozygosity (H_e), effective number of allele (n_e) และ probability of identity (PI) (ตารางที่ 6) พบว่า ได้ค่า H_o อยู่ระหว่าง 0.3030-0.9355 โดยมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.6155 และมีค่า H_e อยู่ระหว่าง 0.3150-0.7438 มีค่าเฉลี่ย 0.5809 ซึ่งใกล้เคียงกับที่พบในการตรวจสอบดีเอ็นเอของกล้วยไม้ *Gymnadenia conopsea* (Gustafsson and Thorén, 2001; Compbell *et al.*, 2002)

และ *Serapias vameracea* (Pellegrino *et al.*, 2001) ซึ่งใช้เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ เช่นเดียวกัน และคำนวณค่า effective number of allele (n_e) ได้ค่าอยู่ระหว่าง 1.4598-3.9031 โดยมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 2.6172 โดยพบว่าไมโครเมอร์หลายคู่ ที่มีค่า n_e ต่ำกว่าจำนวนแอลลีลที่พบจริงค่อนข้างมาก เช่น ไมโครเมอร์ C225 พบจำนวนแอลลีล 9 แอลลีล แต่มีค่า n_e เพียง 1.9377 หรือไมโครเมอร์ MOK29 ซึ่งมีจำนวน 5 แอลลีล แต่มีค่า heterozygosity และค่า effective number of allele ต่ำที่สุดเมื่อเทียบกับไมโครเมอร์คู่อื่นๆ ทั้งนี้เนื่องจากมีบางแอลลีลที่พบเกือบทุกตัวอย่าง (common allele) และบางแอลลีลพบน้อย หรือมีความถี่ต่ำมาก (rare allele) ทำให้ตำแหน่งดังกล่าวมีโพลิเมอร์ฟิซึมต่ำ ไม่เหมาะสำหรับใช้แยกความแตกต่างของกล้วยไม้แต่ละตัวอย่าง

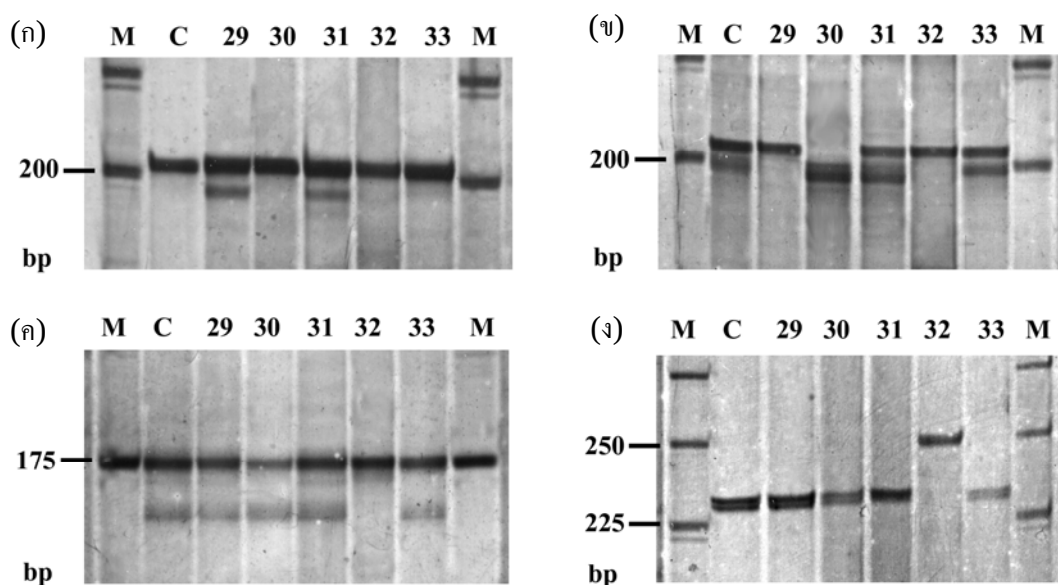
จากการคำนวณค่าความน่าจะเป็นที่ตัวอย่าง 2 ตัวอย่างที่สุ่มเลือกมาจะมีจีโนไทป์เหมือนกัน (probability of identity, PI) เพื่อให้ทราบโอกาสที่จะใช้ในการแยกความแตกต่างของตัวอย่าง ณ เครื่องหมายดีเอ็นเอตำแหน่งนั้นๆ (Kaul *et al.*, 2001) พบว่ามีค่าอยู่ระหว่าง 0.1105 ในคู่ไมโครเมอร์ C364 ถึง 0.4843 ในคู่ไมโครเมอร์ MOK29 แสดงว่ามีโอกาสที่จะพบกล้วยไม้ที่มีจีโนไทป์เหมือนกันที่ตำแหน่ง C364 เป็น 1 ใน 9 และที่ตำแหน่ง MOK29 เป็น 1 ใน 2 ซึ่งค่า PI ยิ่งต่ำ โอกาสที่จะพบจีโนไทป์เหมือนกันก็ยิ่งน้อยลง และเมื่อตรวจสอบความแตกต่างโดยใช้ตำแหน่งของเครื่องหมายดีเอ็นเอ (ไมโครเมอร์) มากขึ้น ค่า PI ก็จะยิ่งต่ำลงไปอีก โดยถ้าใช้ไมโครเมอร์ทั้ง 9 คู่ จะมีค่า PI รวมเท่ากับ 9.6425×10^{-7} หรือประมาณ 1 ใน 1,000,000 ซึ่งหมายถึง โอกาสที่จะพบตัวอย่างกล้วยไม้ 2 ตัวอย่างที่สุ่มเลือกมา มีจีโนไทป์ของไมโครแซทเทลไลต์เหมือนกันทั้ง 9 ตำแหน่ง เป็น 1 ใน 1,000,000 ซึ่งนับว่าเป็นโอกาสต่ำมาก ในการแยกความแตกต่างของพันธุ์กล้วยไม้ อาจไม่จำเป็นต้องตรวจสอบครบทั้ง 9 ตำแหน่งก็ได้ โดยเลือกคู่ไมโครเมอร์ที่มีค่า PI ต่ำที่สุดมาใช้ตรวจสอบก่อน หรืออาจเลือกจากค่า expected heterozygosity จากไมโครเมอร์ที่มีค่าสูงก็ได้เช่นเดียวกัน เนื่องจากไมโครเมอร์ที่มีค่า H_e สูง แสดงว่ามีความแปรปรวนทางพันธุกรรมสูง มีความสัมพันธ์กลับกับค่า PI คือ ค่า PI จะต่ำ สามารถแยกความแตกต่างได้ดีนั่นเอง

ตารางที่ 6 จำนวนแอลลีล ขนาดผลผลิตพีซีอาร์ ค่า observed heterozygosity (H_o), expected heterozygosity (H_e), effective number of allele (n_e) และค่า probability of identity (PI) ของไพรเมอร์ทั้ง 9 คู่

ตำแหน่ง ที่	ไพรเมอร์	จำนวนแอลลีล	ขนาดผลผลิต พีซีอาร์	observed heterozygosity (H_o)	expected heterozygosity (H_e)	effective number of allele (n_e)	probability of identity (PI)	PIรวม
1	C32	3	204-193	0.4828	0.5684	2.3168	0.2502	9.6425x10 ⁻⁷
2	C106	4	193-205	0.6364	0.5394	2.1710	0.3163	
3	C208	8	190-153	0.7273	0.6012	2.5077	0.2070	
4	C225	9	206-263	0.3030	0.4839	1.9377	0.2783	
5	C268	5	187-212	0.4242	0.5495	2.2197	0.2430	
6	C359	6	152-167	0.8788	0.7394	3.8369	0.1114	
7	C364	6	296-316	0.9355	0.7438	3.9031	0.1105	
8	MOK26	8	212-272	0.8484	0.6877	3.2023	0.1460	
9	MOK29	5	155-175	0.3030	0.3150	1.4598	0.4843	
เฉลี่ย		6		0.6155	0.5809	2.6172	0.2386	

3. การตรวจพันธุ์พ่อแม่และลูกผสม

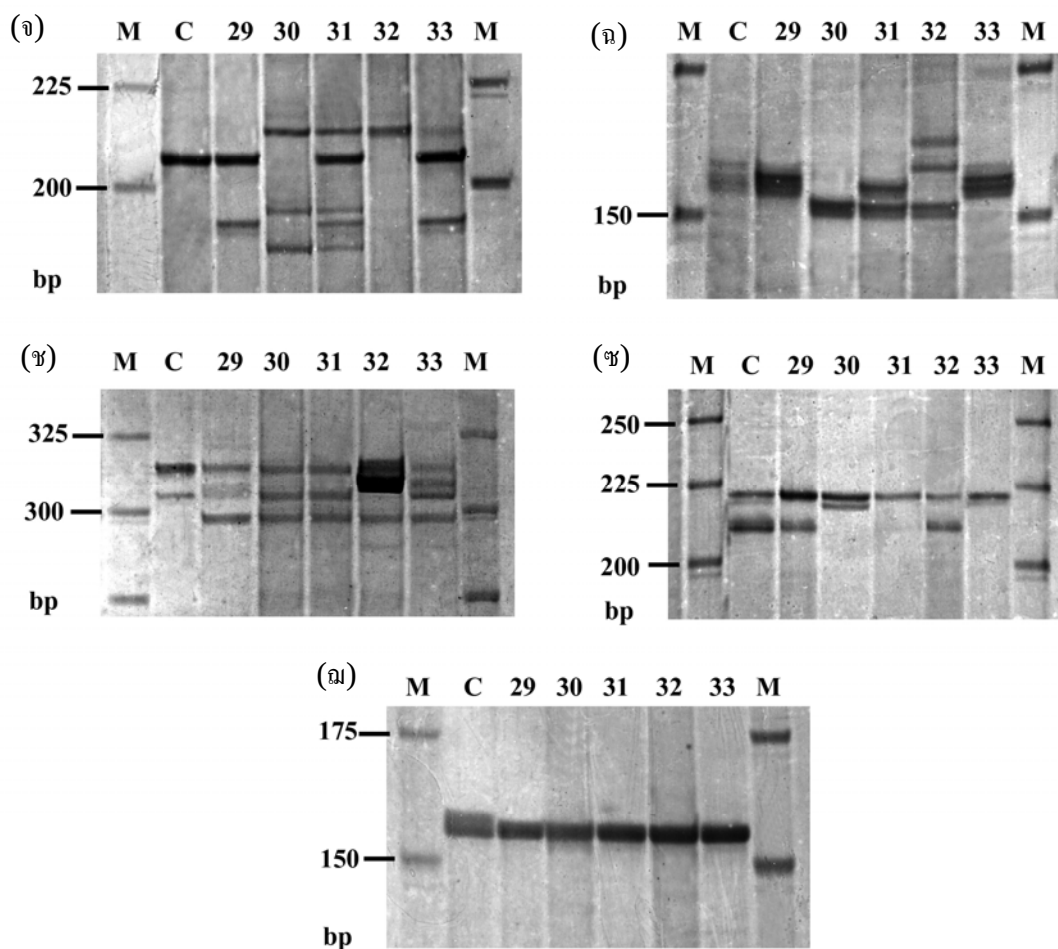
จากตัวอย่างกล้วยไม้ที่เป็นพันธุ์พ่อแม่ พันธุ์แม่และลูกผสม จำนวน 2 ชุด (5 ตัวอย่าง) โดยชุดแรก คือ *Vanda* Doctor Anek (ตัวอย่างที่ 29) กับ *Aranda* Christine (ตัวอย่างที่ 30) ลูกผสม คือ *Aranda* Woleco (ตัวอย่างที่ 31) และชุดที่สองคือ *Vanda* Doctor Anek (ตัวอย่างที่ 29) กับ *Vanda* *sanderiana* (ตัวอย่างที่ 32) ลูกผสม คือ *Vanda* Doctor Anek x *Vanda* *sanderiana* (ตัวอย่างที่ 33) เมื่อนำมาตรวจสอบด้วยไพรเมอร์ทั้ง 9 คู่ (ภาพที่ 11) พบว่า พันธุ์พ่อแม่ และลูกผสมชุดที่ 1 มีจีโนไทป์สอดคล้องกันทั้ง 9 ตำแหน่ง จึงเป็นไปได้ว่า ตัวอย่างกล้วยไม้ทั้ง 3 น่าจะเป็นพันธุ์พ่อแม่และลูกผสม แต่ในชุดที่ 2 พบว่า พันธุ์พ่อแม่ และลูกผสม มีจีโนไทป์สอดคล้องกันเพียงบางตำแหน่ง คือ ในไพรเมอร์ C32, C208, C364, MOK26 และ MOK29 แต่ในไพรเมอร์ C106, C225, C268 และ C359 นั้น ดัชนิลูกผสมมีจีโนไทป์ไม่สอดคล้องกับพันธุ์พ่อแม่ สาเหตุน่าจะมาจากตัวอย่างดีเอ็นเอที่ใช้ มาจากต้นที่ไม่ได้ใช้ผสมจริง เป็นเพียงตัวอย่างจากพันธุ์เดียวกันเท่านั้น แสดงว่าต้นพันธุ์ที่ใช้เป็นพันธุ์พ่อแม่ยังไม่คงตัวอย่างแท้จริง



ภาพที่ 11 ผลการตรวจพันธุ์พ่อแม่และลูกผสม ด้วยไพรเมอร์ C32 (ก) C106 (ข) C208 (ค)

C225 (ง) C268 (จ) C359 (ฉ) C364 (ช) MOK26 (ซ) และ MOK29 (ฌ)

(M คือ แลปดีเอ็นเอมาตรฐาน C คือ *Vanda* Robert's Delight เป็น control 29 คือ *Vanda* Doctor Anek 30 คือ *Aranda* Christine 31 คือ *Aranda* Woleco 32 คือ *Vanda* *sanderiana* 33 คือ *Vanda* Doctor Anek x *Vanda* *sanderiana*)



ภาพที่ 11 (ต่อ)

4. การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม

นำผลการตรวจสอบดีเอ็นเอของกล้วยไม้ทั้ง 33 ตัวอย่าง ด้วยไพรเมอร์ทั้ง 9 คู่ มาวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมในรูปของ dendrogram โดยใช้โปรแกรม NTSYS-pc version 2.1m โดยใช้สูตรของ (Nei and Li, 1978) คำนวณค่าดัชนีความเหมือนและความแตกต่างของตัวอย่างทีละคู่ (similarity index) จนครบทุกตัวอย่าง (ตารางที่ 7) จากนั้นนำค่าที่ได้มาจัดกลุ่มความสัมพันธ์ด้วยวิธี simple matching (Sneath and Sokal, 1973) พบว่าสามารถจัดกลุ่มแสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้ทั้ง 33 ตัวอย่างได้ ดังภาพที่ 12 ค่าดัชนีความเหมือน (similarity coefficient) มีค่าอยู่ระหว่าง 0.56-0.96 ซึ่งนับว่ามีความใกล้เคียงกันมาก โดยถ้าค่าดัชนีความเหมือน (similarity coefficient) ที่ 0.75 หรือ มีค่าความเหมือนที่ 75 เปอร์เซ็นต์ จะสามารถแบ่งกล้วยไม้แวนด้าได้เป็น 4

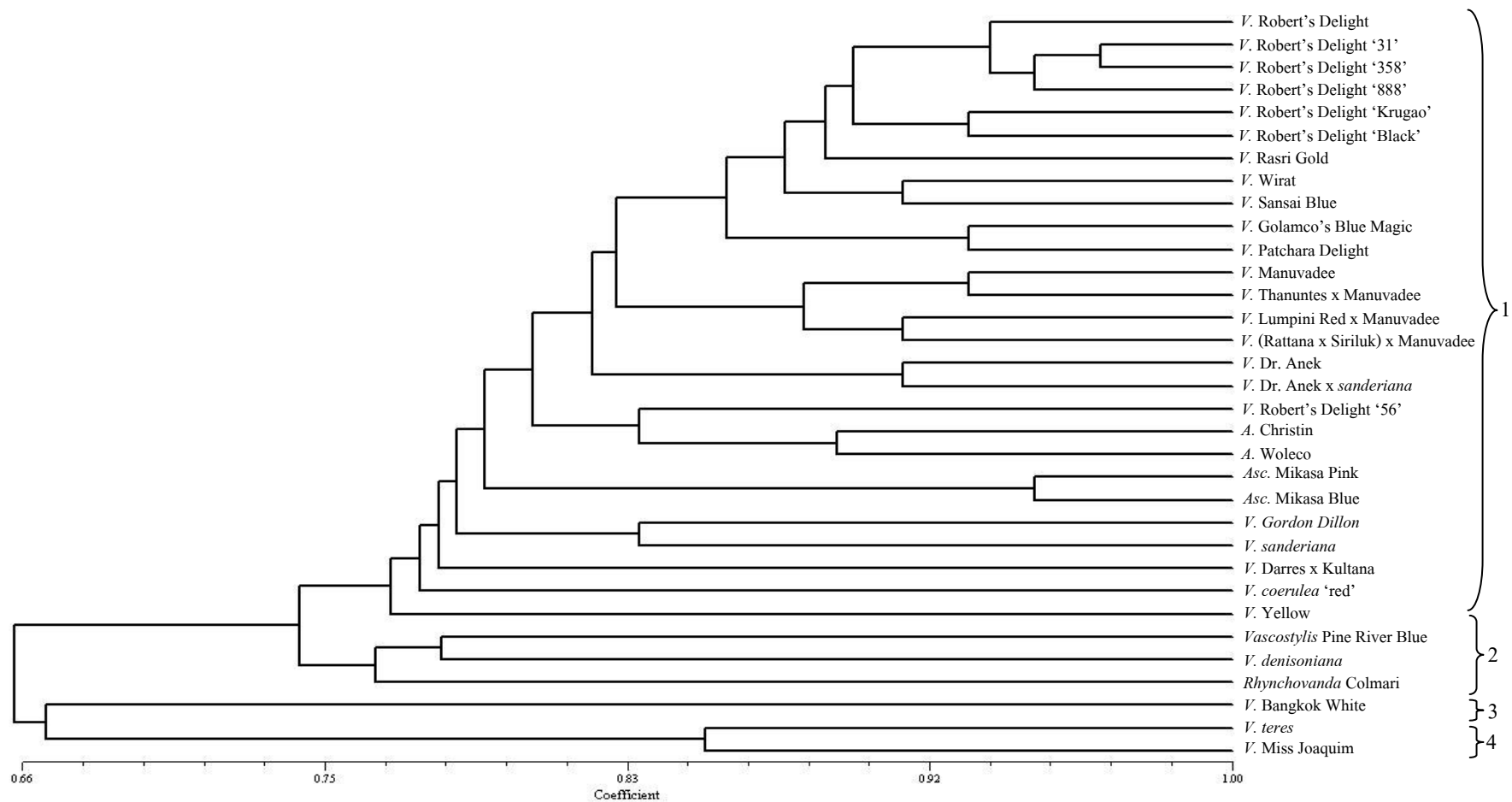
กลุ่ม โดย 3 กลุ่มแรก จัดเป็นกลุ่มของแวนด้าไบแบนทั้งหมด ซึ่งกลุ่มที่ 1 ถือเป็นกลุ่มหลัก ประกอบด้วยกล้วยไม้สกุลแวนด้าจำนวนมากที่สุด ถึง 27 ตัวอย่าง คือ *Vanda* Robert's Delight ทั้ง 7 ตัวอย่าง แวนด้าที่มีสายเลือดของ *Vanda* Manuvadee 4 ตัวอย่าง *V. Rasri Gold*, *V. Wirat*, *V. Sansai blue*, *V. Golamco's Blue Magic*, *V. Pachara Delight*, *V. Gordon Dillon*, *V. Dares x Kultana*, *V. coerulea 'red'*, *V. Yellow*, และ *V. Doctor Anek*, *V. sanderiana* และลูกผสม รวมถึง *Ascocenda* ทั้ง 2 ตัวอย่าง และ *Aranda* อีก 2 ตัวอย่างด้วย สำหรับกลุ่มที่ 2 มี 3 ตัวอย่าง คือ *Vascostylis Pine River Blue* ซึ่งเป็นลูกผสมของกล้วยไม้สกุลเข็ม สกุลช้าง และสกุลแวนด้า *V. denisoniana* และ *Rhynchovanda Colmari* ซึ่งเป็นลูกผสมของกล้วยไม้สกุลแวนด้ากับกล้วยไม้สกุลช้าง ในกลุ่มที่ 3 นั้น ประกอบด้วยกล้วยไม้ *Vanda Bangkok White* เพียงตัวอย่างเดียวเท่านั้น ซึ่งสาเหตุที่กล้วยไม้ทั้ง 4 ตัวอย่าง ในกลุ่มที่ 2 และกลุ่มที่ 3 ซึ่งเป็นแวนด้าไบแบน ถูกแยกออกมาจากกลุ่มหลักนั้น อาจเป็นเพราะมีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมน้อยกว่าแวนด้าไบแบนตัวอย่างอื่นๆ ในกลุ่มหลักโดยพบว่า *Vanda Bangkok White* (กลุ่มที่ 3) มีความสัมพันธ์กับแวนด้าไบแบนตัวอย่างอื่นน้อยที่สุด สำหรับในกลุ่มที่ 4 เป็นกลุ่มของแวนด้าไบกลมทั้ง 2 ตัวอย่าง คือ *Vanda teres* และ *Vanda Miss Joaquim* โดยสามารถแยกออกจากกลุ่มอื่น ซึ่งเป็นแวนด้าไบแบนได้อย่างชัดเจน เนื่องจากมีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมกับพันธุ์อื่นน้อยที่สุด ซึ่งก็ตรงกับลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแวนด้าไบกลมที่มีลักษณะใบแตกต่างจากแวนด้าไบแบนอย่างเห็นได้ชัด ในปัจจุบันแวนด้าไบกลมถูกจัดเป็นสกุลใหม่ คือ *Papilionanthe* (Sin et al., 2002)

ตารางที่ 7 ค่า similarity index ที่ได้จากการเปรียบเทียบความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่างกล้วยไม้ 33 ตัวอย่าง

No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
1	1.0000000																
2	0.7592593	1.0000000															
3	0.8333333	0.7777778	1.0000000														
4	0.8333333	0.7407407	0.8148148	1.0000000													
5	0.7592593	0.8148148	0.7777778	0.7407407	1.0000000												
6	0.7962963	0.7777778	0.7407407	0.7407407	0.7037037	1.0000000											
7	0.7962963	0.7407407	0.8148148	0.7777778	0.7037037	0.7777778	1.0000000										
8	0.7592593	0.7777778	0.8148148	0.9259259	0.7407407	0.7037037	0.7407407	1.0000000									
9	0.7407407	0.7962963	0.7962963	0.8703704	0.7592593	0.7592593	0.7592593	0.9074074	1.0000000								
10	0.7962963	0.8518519	0.8518519	0.8518519	0.7777778	0.7777778	0.8148148	0.8888889	0.9074074	1.0000000							
11	0.8148148	0.7592593	0.7962963	0.7592593	0.7592593	0.6851852	0.7222222	0.7222222	0.7037037	0.7962963	1.0000000						
12	0.8703704	0.8148148	0.9259259	0.7777778	0.7777778	0.7407407	0.7777778	0.7777778	0.7592593	0.8148148	0.7962963	1.0000000					
13	0.8148148	0.8703704	0.8333333	0.8333333	0.7962963	0.7592593	0.7592593	0.8333333	0.7777778	0.8703704	0.8148148	0.8333333	1.0000000				
14	0.9444444	0.8148148	0.8518519	0.8148148	0.8148148	0.7407407	0.7777778	0.8148148	0.7962963	0.8518519	0.8333333	0.8888889	0.8333333	1.0000000			
15	0.7962963	0.7777778	0.7407407	0.7037037	0.7407407	0.7037037	0.6666667	0.7037037	0.7222222	0.7777778	0.7592593	0.7777778	0.7962963	0.8148148	1.0000000		
16	0.9074074	0.8518519	0.8888889	0.8148148	0.8148148	0.7777778	0.8148148	0.8518519	0.8333333	0.8888889	0.8333333	0.9259259	0.8703704	0.9629630	0.8148148	1.0000000	
17	0.9444444	0.8148148	0.8518519	0.8148148	0.7777778	0.8148148	0.8148148	0.8148148	0.7962963	0.8518519	0.8333333	0.8888889	0.8703704	0.9259259	0.8148148	0.9629630	1.0000000
18	0.8703704	0.8518519	0.8148148	0.8148148	0.8148148	0.8518519	0.8148148	0.8148148	0.8333333	0.8888889	0.7962963	0.8148148	0.8703704	0.8518519	0.7777778	0.8888889	0.9259259
19	0.8703704	0.8518519	0.8518519	0.7777778	0.8148148	0.8148148	0.8148148	0.8148148	0.8333333	0.8888889	0.7962963	0.8518519	0.8333333	0.8888889	0.7777778	0.9259259	0.9259259
20	0.7222222	0.7777778	0.7037037	0.7037037	0.7037037	0.7777778	0.7407407	0.6666667	0.6851852	0.7407407	0.6481481	0.6666667	0.7592593	0.6666667	0.6666667	0.7037037	0.7407407
21	0.7777778	0.7962963	0.7962963	0.7592593	0.6851852	0.7592593	0.7222222	0.7592593	0.7777778	0.8333333	0.7407407	0.7592593	0.8148148	0.7962963	0.7592593	0.8333333	0.8333333
22	0.7962963	0.7777778	0.8148148	0.7777778	0.6666667	0.7777778	0.7407407	0.7407407	0.7592593	0.8148148	0.7222222	0.8148148	0.7962963	0.7777778	0.7407407	0.8148148	0.8148148
23	0.8703704	0.8518519	0.8518519	0.8888889	0.8148148	0.8148148	0.8148148	0.8888889	0.8703704	0.8888889	0.7962963	0.8518519	0.9074074	0.8888889	0.8148148	0.9259259	0.9259259
24	0.6111111	0.6666667	0.6296296	0.6666667	0.6296296	0.5925926	0.5925926	0.7037037	0.7222222	0.6666667	0.6481481	0.6296296	0.6481481	0.6666667	0.5555556	0.7037037	0.6666667
25	0.8518519	0.8333333	0.8703704	0.8333333	0.8703704	0.7592593	0.7962963	0.8333333	0.8518519	0.8703704	0.8518519	0.8703704	0.8148148	0.9074074	0.7592593	0.9074074	0.8703704
26	0.7592593	0.7777778	0.7777778	0.8148148	0.7037037	0.6666667	0.7407407	0.7777778	0.7592593	0.8148148	0.7222222	0.7407407	0.8333333	0.7407407	0.7407407	0.7777778	0.7777778
27	0.6481481	0.7037037	0.6666667	0.7037037	0.6666667	0.7037037	0.7407407	0.6666667	0.7222222	0.7407407	0.6111111	0.6296296	0.6851852	0.6296296	0.6666667	0.6666667	0.6666667
28	0.6111111	0.6296296	0.6296296	0.7037037	0.5925926	0.6666667	0.7037037	0.6666667	0.7592593	0.6666667	0.6111111	0.5925926	0.6111111	0.5925926	0.6296296	0.6296296	0.6296296
29	0.8703704	0.7037037	0.7777778	0.8518519	0.7037037	0.7407407	0.7777778	0.8518519	0.7592593	0.7777778	0.7592593	0.8148148	0.7962963	0.8518519	0.7407407	0.8518519	0.8518519
30	0.7962963	0.7407407	0.7777778	0.8518519	0.7777778	0.7037037	0.7037037	0.8148148	0.8333333	0.8148148	0.7222222	0.7777778	0.8333333	0.8148148	0.8148148	0.8148148	0.8148148
31	0.7962963	0.7407407	0.7407407	0.8148148	0.7037037	0.7037037	0.7037037	0.8518519	0.7962963	0.8518519	0.7592593	0.7777778	0.8333333	0.8148148	0.8518519	0.8518519	0.8518519
32	0.7407407	0.8333333	0.7222222	0.7592593	0.7222222	0.7592593	0.7962963	0.7592593	0.7777778	0.7962963	0.7407407	0.7222222	0.8518519	0.7592593	0.7222222	0.7962963	0.7962963
33	0.8518519	0.7592593	0.7592593	0.7962963	0.7222222	0.6851852	0.7222222	0.8333333	0.8148148	0.7962963	0.7407407	0.7962963	0.8148148	0.8703704	0.7962963	0.8703704	0.8703704

ตารางที่ 7 (ต่อ)

No.	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33
1																
2																
3																
4																
5																
6																
7																
8																
9																
10																
11																
12																
13																
14																
15																
16																
17																
18	1.0000000															
19	0.9259259	1.0000000														
20	0.8148148	0.7407407	1.0000000													
21	0.8333333	0.7962963	0.6481481	1.0000000												
22	0.8148148	0.7777778	0.6666667	0.9444444	1.0000000											
23	0.9259259	0.8888889	0.7407407	0.8703704	0.8518519	1.0000000										
24	0.7037037	0.6666667	0.5925926	0.6111111	0.5925926	0.7037037	1.0000000									
25	0.8703704	0.9074074	0.6851852	0.7777778	0.7592593	0.9074074	0.6851852	1.0000000								
26	0.7407407	0.7777778	0.7037037	0.7592593	0.7407407	0.8148148	0.5555556	0.7592593	1.0000000							
27	0.7037037	0.6666667	0.7037037	0.6481481	0.6666667	0.7407407	0.6296296	0.6851852	0.7407407	1.0000000						
28	0.6296296	0.5925926	0.6296296	0.6111111	0.6296296	0.6666667	0.7037037	0.6111111	0.6296296	0.8518519	1.0000000					
29	0.7777778	0.7777778	0.6666667	0.7222222	0.7407407	0.8518519	0.6666667	0.7962963	0.7777778	0.6666667	0.6666667	1.0000000				
30	0.8148148	0.8148148	0.6296296	0.7962963	0.7777778	0.8888889	0.6296296	0.8333333	0.7777778	0.6666667	0.6296296	0.7407407	1.0000000			
31	0.8148148	0.8148148	0.6296296	0.7962963	0.7777778	0.8888889	0.6296296	0.7962963	0.8148148	0.6666667	0.6296296	0.8518519	0.8888889	1.0000000		
32	0.8333333	0.7962963	0.7592593	0.7407407	0.7222222	0.8333333	0.7592593	0.7777778	0.7222222	0.7592593	0.7222222	0.7222222	0.7592593	0.7222222	1.0000000	
33	0.7962963	0.7962963	0.6481481	0.7777778	0.7592593	0.8703704	0.6851852	0.8148148	0.7962963	0.6481481	0.6481481	0.9074074	0.7962963	0.8703704	0.7407407	1.0000000



ภาพที่ 12 ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของตัวอย่างกล้วยไม้ทั้ง 33 ตัวอย่าง จากการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม NTSYS-pc version 2.1m

สรุป

จากการพัฒนาเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ เพื่อตรวจสอบกล้วยไม้สกุลแวนด้า โดยใช้วิธี Microsatellite enrichment เมื่อทำ dot blot hybridization พบว่าห้องสมุดจีโนมที่ใช้โพรบแบบ dinucleotide repeat ได้โคลนที่ให้ผลบวก 82.45 เปอร์เซ็นต์ และห้องสมุดจีโนมที่ใช้โพรบแบบ trinucleotide repeat ได้โคลนที่ให้ผลบวก 9.91 เปอร์เซ็นต์ เมื่อนำโคลนทั้งหมดที่ได้มาหาลำดับเบส พบว่ามีลำดับเบสแบบไมโครแซทเทลไลท์ 83.12 เปอร์เซ็นต์

จากการวิเคราะห์โคลนที่มีลำดับเบสแบบไมโครแซทเทลไลท์ พบว่ากล้วยไม้สกุลแวนด้า ส่วนใหญ่มีลำดับเบสซ้ำชนิด compound repeat แบบ $(GA)_n(GT)_n$ คิดเป็น 45.19 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาเป็นลำดับเบสซ้ำชนิด dinucleotide repeat แบบ $(GA)_n$ 22.59 เปอร์เซ็นต์ และ $(CA)_n$ 15.93 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ สำหรับลำดับเบสซ้ำชนิด trinucleotide repeat จะพบแบบ $(CCT)_n$ มากที่สุด คิดเป็น 9.26 เปอร์เซ็นต์ โดยสามารถออกแบบไพรเมอร์ได้ทั้งหมด 56 คู่ คัดเลือกคู่ไพรเมอร์ที่ให้ผลผลิตพีซีอาร์เป็นไปตามขนาดที่คาดหมายได้ 7 คู่

นำไพรเมอร์ที่คัดเลือกได้ทั้งหมด 7 คู่ และไพรเมอร์ที่พัฒนาจากกล้วยไม้มอคคาร่าจำนวน 2 คู่ มาตรวจสอบกล้วยไม้สกุลแวนด้าทั้งหมด 33 ตัวอย่าง พบว่ามีจำนวนแอลลีลอยู่ระหว่าง 3-9 แอลลีล เฉลี่ย 6 แอลลีลต่อไพรเมอร์ โดยมีขนาดตั้งแต่ 152-316 คู่เบส เมื่อคำนวณค่า observed heterozygosity (H_o) พบว่ามีค่าอยู่ระหว่าง 0.3030-0.9355 เฉลี่ย 0.6150 และมีค่า expected heterozygosity (H_e) อยู่ระหว่าง 0.3150-0.7438 เฉลี่ย 0.5813 จากการใช้ไพรเมอร์ทั้ง 9 คู่ พบว่าค่า probability of identity (PI) มีค่าเท่ากับ 9.4179×10^{-7} หรือประมาณ 1 ใน 1,000,000 ซึ่งน่าจะแยกกล้วยไม้แต่ละชนิดได้ โดยพบว่าไพรเมอร์ C364 มีค่า PI ต่ำที่สุด จึงมีประสิทธิภาพในการแยกความแตกต่างของกล้วยไม้ได้ดีที่สุด รองลงมาได้แก่ไพรเมอร์ C359, MOK26, C208, C268, C32, C225, C106 และ MOK29 ตามลำดับ และเมื่อนำไพรเมอร์ทั้งหมดมาตรวจสอบความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่างพ่อแม่ และลูกผสม จำนวน 2 คู่ พบว่า พันธุ์ *Vanda* Doctor Anek (พันธุ์พ่อ), *Aranda* Christine (พันธุ์แม่) และ *Aranda* Woleco (ลูกผสม) มีจีโนไทป์สอดคล้องกัน จึงน่าจะเป็นพ่อแม่ลูกกันจริง แต่ในพันธุ์ *Vanda* Doctor Anek กับ *Vanda sanderiana* และลูกผสม *Vanda* Doctor Anek x *Vanda sanderiana* นั้น มีจีโนไทป์ไม่สอดคล้องกัน จึงอาจไม่ใช่ต้นพ่อแม่ลูกที่แท้จริง

เมื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม โดยใช้โปรแกรม NTSYS-pc version 2.1m พบว่าสามารถแยกกล้วยไม้แวนด้าได้เป็น 4 กลุ่ม โดย 3 กลุ่มแรก เป็นกลุ่มของแวนด้าไบแบน ทั้งหมด กลุ่มที่ 1 ถือเป็นกลุ่มหลัก ประกอบด้วยกล้วยไม้สกุลแวนด้าจำนวนมากที่สุดถึง 27 ตัวอย่าง สำหรับกลุ่มที่ 2 มี 3 ตัวอย่าง คือ *Vascostylis* Pine River Blue, *V. denisoniana* และ *Rhynchovanda* Colmari ส่วนกลุ่มที่ 3 นั้น ประกอบด้วยกล้วยไม้ *Vanda* Bangkok White เพียงตัวอย่างเดียว โดยพบว่า *Vanda* Bangkok White ที่มีความสัมพันธ์กับแวนด้าไบแบนตัวอย่างอื่นน้อยที่สุด และกลุ่มที่ 4 เป็นกลุ่มของแวนด้าไบกลม (*Vanda teres* และ *Vanda* Miss Joaquim) ซึ่งสามารถแยกออกจากกลุ่มอื่นที่เป็นแวนด้าไบแบนได้อย่างชัดเจน

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

ครรชิต ธรรมศิริ. 2547. เทคโนโลยีการผลิตกล้วยไม้. บมจ. อัมรินทร์พรินติงเอนด์พับลิชชิง, กรุงเทพฯ.

จุลภาค คั่นวงศ์, ทิพวัลย์ อยู่ชา, พนิดา ฐาตุจิรวงศ์กุล และณัฐพร คั่นวงศ์. 2548. การสร้างจีเอ็นเอเครื่องหมายชนิด SSLP ของกล้วยไม้สกุลหวาย. ใน การประชุมประจำปี สวทช. ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ, ปทุมธานี.

ไชยา ลาวัลย์. 2534. แวนด้า. พิมพ์ครั้งที่ 1. สำนักพิมพ์ฐานเกษตรกรรม, กรุงเทพฯ.

ณัฏยา ศรีสวัสดิ์. 2545. การตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเมล็ดพันธุ์ลูกผสมมะเขือเทศโดยการใช้ดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิดไมโครแซทเทลไลท์. ปัญหาพิเศษปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ดวงพร อังสุมาลี. 2543. การจำแนกแวนด้าฟ้ามุ่ย แวนด้าแซนเดอเรียน่า และแวนด้าลูกผสมโดย RAPD. ปัญหาพิเศษปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ปฐพีชล วาอุอ์คี. 2547. คู่มือกล้วยไม้. ครั้งที่ 1. เฟท-แพล้น พับลิชชิง, กรุงเทพฯ.

ประเดิม วนิชชนานันท์. 2543. การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างชนิดของกล้วยไม้รองเท้านารีหมวด *Brachypetalum* ด้วยเทคนิค RAPD. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ปรีชา ประเทพา และ ปิยวรา มีชัยโย. 2548. ลักษณะโมเลกุลของไมโครแซทเทลไลท์อาร์เอ็ม 17 ในพันธุ์ข้าวหอมและไม้หอมของไทย, น. 378-392. ใน การประชุมวิชาการพันธุศาสตร์แห่งชาติ ครั้งที่ 14. บริษัท เท็กซ์ แอนด์ เจอร์นัล พับลิเคชั่น จำกัด, กรุงเทพฯ.

มาลินี อนุพันธ์สกุล. 2542. กล้วยไม้. สำนักพิมพ์เกษตรบุ๊ค พับลิเคชั่น, นนทบุรี.

ระพี สาคริก. 2530. **กล้วยไม้**. สำนักพิมพ์ช่อนนทรี, กรุงเทพฯ.

วีระชัย ฌ นกร. 2548. ศักยภาพของกล้วยไม้ไทยเพื่อการพัฒนาเชิงการค้า, น. 1-2. ใน **การประชุมประจำปี สวทช . ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ, ปทุมธานี**.

สุรินทร์ ปิยะโชคนากุล. 2545. **จีโนมและเครื่องหมายดีเอ็นเอ ปฏิบัติการอาร์เอฟดีและเอฟแอลพี**. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

_____. 2549. เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์, น. 19-23. **เอกสารประกอบการอบรมเชิงปฏิบัติการเรื่อง การวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมโดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ**. กรุงเทพฯ.

_____, จีรัตน์ มงคลศิริวัฒนา, พัฒนา ศรีฟ้า สุนเนอร์, นิสารัตน์ ลิ้มสลักเพชร, ศิรินรัตน์ วรรณภินพส์ และ เอกรัฐ หิตโกเมต. การตรวจดีเอ็นเอของกล้วยไม้สกุลหวายโดย PCR-RFLP, น. 408-413. ใน **การประชุมวิชาการพันธุศาสตร์แห่งชาติ ครั้งที่ 14**. บริษัท เท็กซ์ แอนด์ เจอร์นัล พับลิเคชั่น จำกัด, กรุงเทพฯ.

สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. 2550. **ดอกกล้วยไม้สด**. สถิตินำเข้า-ส่งออก. แหล่งที่มา:

<http://www.oae.go.th/statistic/export/1301OC.xls>, 19 กันยายน 2550.

สำอังก์ เนตรนารี. 2548. **กล้วยไม้**. พิมพ์ครั้งที่ 4. อักษรสยามการพิมพ์, กรุงเทพฯ.

อรรรัตน์ มงคลพร. 2543. **การสร้าง microsatellite marker สำหรับพริก**. สถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

Areshchenkova, T. and M.W. Ganai. 2002. Comparative analysis of polymorphism and chromosomal location of tomato microsatellite markers isolated from different sources. **Theor. Appl. Genet.** 104: 229-235.

- Ashworth, V.E.T.M., M.C. Kobayashi, M. De La Cruz and M.T. Clegg. 2004. Microsatellite markers in avocado (*Persea americana* Mill.): development of dinucleotide and trinucleotide markers. **Scientia Hort.** 101: 225-267.
- Benner, M.S., M.D. Braunstein and M.U. Weisburg. 1995. Detection of DNA polymorphism within the genus *Cattleya* (Orchidaceae). **Plant Mol. Biol. Rept.** 13: 147-155.
- Bertini, C.H.C.M., I. Schuster, T. Sedyama and E.G. Barros. 2006. Characterization and genetic diversity analysis of cotton cultivars using microsatellites. **Genet. Mol. Biol.** 29: 321-329.
- Billotte, N., A.M. Risterucci, E. Barcelos, J.L. Noyer, P. Amblard and F.C. Baurens. 2001. Development, characterization, and across-taxa utility of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq) microsatellite markers. **Genome** 44:413-425.
- Bouhadida, M., A.M. Casas and M.A. Moreno. 2007. Molecular characterization of Miraflores peach variety and relatives using SSRs. **Scientia Hort.** 111: 140-145.
- Butcher, P.A., S. Decroocq, Y. Gray and G.F. Moran. 2002. Developmental, inheritance and across-species amplification of microsatellite markers from *Acacia mangium*. **Theor. Appl. Genet.** 101:1282-1290.
- Callen, D.F., A.D. Thompson, Y. Shen, H.A. Phillips, R.I. Richards, J.C. Mulley and G.R. Sutherland. 1993. Incidence and origin of null allele in the (AC)_n microsatellite markers. **Am. J. Hum. Genet.** 52: 922-927.
- Che, K.P., Q.C. Zhan, Q.H. Zing, Z.P. Wang, D.M. Jin, D.J. He and B. Wang. 2003. Tagging and mapping of rice sheath blight resistant gene. **Theor. Appl. Genet.** 106: 293-297.

- Chen, X., S.H. Lim, S.M. Wong, L.H. Lee, J. Kuo, T.W. Yam and J.J. Lin. 1999. Amplified fragment length polymorphism analysis of *Vandaceous* orchids. **Plant Sci.** 141: 183-189.
- Chen, X.M., Y.H. Lou, X.C. Xai, L.Q. Xai, X. Chen, Z.L. Ren and J.Z. Jia. 2005. Chromosomal location of powdery mildew resistance gene *Pm16* in wheat using SSR marker analysis. **Plant Breed.** 124: 225-228.
- Choi, S.H., M.J. Kim, J.S. Lee and K.H. Ryu. 2006. Genetic diversity and phylogenetic relationships among and within species of oriental cymbidiums based on RAPD analysis. **Scientia Hort.** 108: 79-85.
- Clauss, M.J., H. Cobban and T. Mitchell-Olds. 2002. Cross-species microsatellite markers for elucidating population structure in *Arabidopsis* and *Arabis* (Brassicaceae). **Mol. Ecol.** 11:591-601.
- Compbell, V.V., G. Rowe, T.J.C. Beebee and M.J. Hutchings. 2002. Isolation and characterization of microatellite primers for the fragrant orchid *Gymnadenia conopsea* (L.) R. Brown (Orchidaceae). **Cons. Genet.** 3: 209-210.
- Cordeiro, G.M., T.L. Maguire, K.J. Edwards and R.J. Henry. 1999. Optimisation of a microsatellite enrichment technique in *Saccharum* spp. **Plant Mol. Biol. Rept.** 17:225-229.
- Dellaporta, S.L., J. Wood and J.B. Hicks. 1983. A plant DNA miniprep: version II. **Plant Mol. Biol. Rept.** 1:19-21.
- Dressler, R.L. 1993. **Phylogeny and Classification of the Orchid Family.** Cambridge University Press.

- Edwards, K.J., J.H.A. Barker, A. Daly, C. Janes and A. Karp. 1996. Microsatellite libraries enriched for several microsatellite sequences in plants. **Biotechnology** 20:758-760.
- Gaitán-Solís, E., M.C. Daque, K.J. Edwards and J. Tohme. 2002. Microsatellite repeats in common bean (*Phaseolus vulgaris*): Isolation, characterization, and cross-species amplification in *Phaseolus* spp. **Crop Sci.** 42: 2128-2136.
- Goldstein, David B. and Christian Schölterer. 1999. **Microsatellites Evolution and Application.** 1st ed. Oxford University Press, Great Britain.
- Gustafsson, S. and P.A. Thorén. 2001. Microsatellite loci in *Gymnadenia conopsea*, the fragrant orchid. **Mol. Ecol. Notes** 1:81-82.
- _____ and Sjögren-Gulve. 2002. Genetic diversity in the rare orchid *Gymnadenia odoratissima* and a comparison with the more common congener, *G. conopsea*. **Cons. Genet.** 3: 225-234.
- Gupta, P.K., H.S. Balyan, K.J. Edwards, P. Isaac, V. Korzum, M. Röder, M.F. Gautier, P. Joudrier, A.R. Schlatter, S. Dubcovsky, R.C. De la Pena, M. Khairallah, G. Penner, M.J. Hayden, P. Sharp, B. Keller, R.C.C. Wang, J.P. Hardouin and P. Leroy. 2002. Genetic mapping of 66 new microsatellite (SSR) loci in bread wheat. **Theor. Appl. Genet.** 105: 413-422.
- He, G., R. Meng, M. Newman, G. Gao, R.N. Pittman and C.S. Prakash. 2003. Microsatellite as DNA markers in cultivated peanut (*Arachis hypogaea* L.). **PMC Plant Biol.** 3: 1-6.
- Hüttel, B., P. Winter, K. Weising, W. Choumane, F. Weigand and G. Kahl. 1999. Sequence-tagged microsatellite site markers for chickpea (*Cicer arietinum* L.). **Genome** 42: 210-217.

- Juillet, N., H. Freymond, L. Degen and J. Goudet. 2003. Isolation and characterization of highly polymorphic microsatellite loci in the bladder campion, *Silene vulgaris* (Caryophyllaceae) **Mol. Ecol. Notes** 3: 358-359.
- Kaul, R., A. Singh, R.K. Vijh, M.S. Tania and R.Behl. 2001. Evaluation of the genetic variability of 13 microsatellite markers in native Indian pigs. **J. Genet.** 80: 149-153.
- Kimura, M. and J.F. Crow. 1964. The number of allele that can be maintained in the finite population. **Genetics** 49: 725-738.
- Lehman, T., W.A. Hawley and F.H. Collins. 1996. An evolution of evolutionary constraints on microsatellite loci using null alleles. **Genetics** 144: 1155-1163.
- Levinson, G. and G.A. Gutman. 1987. High frequencies of short frameshifts in poly-CA/TG tandem repeats borne by bacteriophage M13 in *Escherichia coli* K-12. **Nucl. Acids Res.** 15: 5323-5338.
- Li, G. and C.F. Quiros. 2001. Sequence-related amplified polymorphism (SRAP), a new marker system based on a simple PCR reaction: its application to mapping and gene tagging in *Brassica*. **Theor. Appl. Genet.** 103:455-461.
- Li, M., X. Zheng, Y. Zhu, X. Wang, S. Liang, L. Li and X. Wu. 2006. Development and characterization of SSR markers in lychee (*Litchi chinensis*). **Mol. Ecol. Notes** 6: 1205-1207.
- Li, T.X., J.K. Wang, Y.F. Bai, X.D. Sun and Z. Lu. 2004. A novel method for screening species-specific gDNA probe for species identification. **Nucl. Acid Res.** 32: 1-8.
- Lim, A., G.H. Yue, C.L. Lim-Ho and Y. Hong. 2007. Development and characterization of microsatellite in *Vanda* varieties. **Mol. Ecol. Notes** 7: 461-463.

- Lim, S.H., P.C.P. Teng, Y.H. Lee and C.J. Goh. 1999. RAPD analysis of some species in the Genus *Vanda* (Orchidaceae). **Ann. Bot.** 83: 193-196.
- Nayak, S. and G.R. Rout. 2005. Isolation and characterization of microsatellites in *Bambusa arundinacea* and cross species amplification in other bamboos. **Afr. J. Biotechnol.** 4: 151-156.
- Nei, M and W. Li. 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individual. **Genetics** 89: 583-590.
- Padmaja, K.L., N. Arumugam, V. Gupta, A. Mukhopadhyay, Y.S. Yodhi, D. Pental and A.K. Pradhan. 2005. Mapping and tagging of seed coat colour and the identification of microsatellite markers for marker-assisted manipulation of the trait in *Brassica juncea*. **Theor. Appl. Genet.** 111: 8-14.
- Pellegrino, G., D. Cafasso, A. Widmer, M. Solina, A. Musacchio and S. Cozzolino. 2001. Isolation and characterization of microsatellite loci from orchid *Serapias vomeracea* (Orchidaceae) and cross-priming to other *Serapias* species. **Mol. Ecol. Notes** 1: 279-280.
- _____, A. Musacchio, M.E. Noce, A.M. Palermo and A. Widmer. 2004. Reproductive versus floral isolation among morphologically similar *Serapias* L. species (Orchidaceae). **J. Hered.** 96: 15-23.
- Provan, J., W. Powell and P.M. Hollingsworth. 2001. Chloroplast microsatellites: new tools for studies in plant ecology and evolution. **Trends Ecol. Evol.** 16: 142-147.
- Reddy, O.U.K., A.E. Pepper, I. Abdurakhmonov, S. Saha, J.N. Jenkins, T. Brooks, Y. Bolek and K.M. El-Zik. 2001. New dinucleotide and trinucleotide microsatellite marker resources for cotton genome research. **J. Cotton Sci.** 5: 103-113.

- Ritschel, P.S., T.C.L. Lins, R.L. Tristan, G.S.C. Buso, J.A. Buso and M.E. Ferreira. 2004. Development of microsatellite markers from an enriched genomic library for genetic analysis of melon (*Cucumis melo* L.). **BMC Plant Biol.** 4: 1-14.
- Rivera, M.A.J., G.C. Graham and G.K. Roderick. 2003. Isolation and characterization of nine microsatellite loci from the Hawaiian geaupe *Epinephelus quernus* (Serranidae) for population genetic analyses. **Mar. Biotechnol.** 5:126-129.
- Rohlf F.J. 2000. **NTSYS-pc: Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System.** Setanket, New York.
- Sharma, I.K., D.L. Jones, A.G. Young and C.J. French. 2001. Genetic diversity and phylogenetic relatedness among six endemic *Pterostylis* species (Orchidaceae: series *Grandiflorae*) of western Australia, as revealed by allozyme polymorphisms. **Biochem. Syst. Acol.** 29: 679-710.
- Shuttleworth, F.S., H.S. Zim and G.W. Dillon. 1970. **Orchids.** Golden Press. New York.
- Sin, H. C., Y. T. Wing and J. Arditti. 2002. **Biology of *Vanda* Miss Joaquim.** 1st ed. National University of Singapore press, Singapore.
- Smith, G.P. 1976. Evolution of repeated DNA sequences by unequal crossover. **Science** 191: 528-535.
- Sneath, P.H.A. and R.R. Sokal. 1973. **Numerical Taxonomy.** Freeman, San Francisco.
- Soliva, M., B.Gautshi, C. Salzmann, I. Tenzer and A. Widmer. 2000. Isolation and characterization of microsatellite loci in the orchid *Ophrys araneola* (Orchidaceae) and a test cross-species amplification. **Mol. Ecol.** 9:2178-2179.

- Stajner, N., J. Jakse, P. Kozjak and B. Javornik. 2005. The isolation and characterization of microsatellites in hop (*Humulus lupulus* L.). **J. Plant Sci.** 168: 213-221.
- Streisinger, G., Y. Okada, J. Emrich, J. Newton and A. Tsugita and E. Terzaghi. 1966. Frameshift mutations and the genetic code. **Cold spring Harbor Symposium on Quantitative Biology** 31: 77-84.
- Sun, M. and K.C. Wong. 2001. Genetic structure of three orchid species with contrasting breeding systems using RAPD and allozyme markers. **Am. J. Bot.** 88: 2180-2188.
- Tang, B., Y.H. Huang, L. Lin, X.X. Hu, J.D. Feng, P. Yao, L. Zhang and N. Li. 2003. Isolation and characterization of 70 novel microsatellite markers from ostrich (*Struthio camelus*) genome. **Genome** 46:833-840.
- Tsai, C.C., C.I. Peng, S.C. Huang, P.L. Huang and C.H. Chou. 2004. Determination of the genetic relationship of *Dendrobium* species (Orchidaceae) in Taiwan based on the sequence of the internal transcribed spacer of ribosomal DNA. **Scientia Hort.** 101: 315-325.
- _____, S.C. Huang, P.L. Huang, Y.S. Chen and C.H. Chou. 2002. Phenetic relationship and identification of subtribe *Oncidaciinae* genotype by random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. **Scientia Hort.** 96: 303-312.
- Vos, P., R. Hogers, M. Blecker, M. Reijans, T. van de Lee, M. Hornes, A. Frijters, J. Pot, J. Peleman, M. Kuiper and M. Zabeau. 1995. AFLP: A new technique for DNA fingerprinting. **Nucl. Acids Res.** 23: 4407-4414.
- Wang, Z., J.L. Weber, G. Zhong and S.D. Tanksley. 1994. Survey of plant short tandem DNA repeats. **Theor. Appl. Genet.** 88: 1-6.

- Weber, J.L. and P.E. May. 1989. Abundant class of human DNA polymorphisms with can be types using polymerase chain reaction. **Am. J. Hum. Genet.** 44: 388-396.
- Wei, Y.M., Y.C. Hou, Z.H. Yan, W. Wu, Z.O. Zhang, D.C. Liu and Y.L. Zheng. 2005. Microsatellite DNA polymorphism divergence in Chinese wheat (*Triticum aestivum* L.) landraces highly resistant to *Furarium* head blight. **J. Appl. Genet.** 46 : 3-9.
- Williams, J.G.K., A.R. Kubelik, K.I. Livak, J.A. Rafalski and S.V. Tingey. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucl. Acids Res.** 18:6231-6235.
- Yaish, M.W.F. and M. Pérez de la Vega. 2003. Isoalation of (GA)_n microsatellite sequences and description of a predicted MADS-box sequence isolated from common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Genet. Mol. Biol.** 3: 337-342.
- Yang, W., D.B. Weaver, B.L. Neilsen and J. Qiu. 2001. Molecular mapping of a new gene for resistance to frogeye leaf spot of soya bean in 'Peking'. **Plant Breed.** 120: 73-78.
- Yue, G.H., L.T. Lam-Chan and Y. Hong. 2006. Development of simple sequence repeat (SSR) markers and their use in identification of *Dendrobium* varieties. **Mol. Ecol. Notes** 6 : 832-834.
- Zhang, D.P., D. Carbajulca, L. Ojeda, G. Rossel, S. Milla, C. Herrera and M. Ghislain. 1999. Microsatellite analysis of genetic diversity in sweet potato varieties from Latin America. **CIP Program Report:** 295-301.
- Zhao, W., X. Miao, S. Jia, Y. Pan and Y. Huang. 2005. Isolation and characterization of microsatellite loci from mulberry, *Morus* L. **J. Plant Sci.** 168: 519-525.

Zhu, Z., R. Zhou, X. Kong, Y. Dong and J. Jia. 2005. Microsatellite markers linked to 2 powdery mildew resistance genes introgressed from *Triticum carthlicum* accession PS5 into common wheat. **Genome** 48: 585-590.

ภาคผนวก

1. การสกัดแยกดีเอ็นเอจากกล้วยไม้

1.1 นำใบกล้วยไม้ประมาณ 3 กรัม มาบดให้ละเอียดในไนโตรเจนเหลว แล้วถ่ายใส่หลอดเซนตริฟิวจ์ ที่มี extraction buffer (10 mM Tris-HCl, 5 mM EDTA, 50 mM NaCl) ปริมาตร 15 มิลลิลิตร และ 2-mercaptoethanol ปริมาตร 300 ไมโครลิตร ที่บ่มไว้ที่ 65 องศาเซลเซียส

1.2 เติม 20% SDS ลงไป 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน โดยเขย่าอย่างแรง บ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที ผสมโดยกลับหลอดไปมาเป็นครั้งคราว

1.3 เติมโปแตสเซียมอะซิเตท เข้มข้น 5 โมลาร์ ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน โดยเขย่าอย่างแรง แล้วแช่ในน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที

1.4 ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที

1.5 คูดสารละลายใสส่วนบนใส่หลอดใหม่ แล้วเติมคลอโรฟอร์ม: ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (24:1) ลงไป 1 เท่าของปริมาตรสารละลายที่ดูมา ผสมโดยกลับหลอดไปมา

1.6 ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 นาที

1.7 คูดสารละลายใสส่วนบน ใส่ในหลอดใหม่ เติมไอโซโพรพานอล ปริมาตร 0.7 เท่าของสารละลายที่ดูมา ผสมเบาๆ นำไปเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที

1.8 เกี่ยวตะกอนดีเอ็นเอขึ้นมาใส่หลอดเซนตริฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร แล้วผึ่งให้ตะกอนดีเอ็นเอแห้ง

1.9 เติมโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 2 โมลาร์ ปริมาตร 300 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส จนตะกอนละลายหมด

1.10 เติม absolute ethanol ปริมาตร 2 เท่าของปริมาตรสารละลายที่มี เพื่อตกตะกอนดีเอ็นเอ แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 นาที

1.11 เทสารละลายทิ้ง ล้างตะกอนด้วยเอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 500 ไมโครลิตร

1.12 ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที

1.13 ทำตามข้อ 1.11-1.12 ซ้ำอีกครั้ง

1.14 เทสารละลายออก แล้วปล่อยให้ตะกอนดีเอ็นเอแห้ง

1.15 ละลายตะกอนด้วย RNase buffer (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 15 mM NaCl) ปริมาตร 200 ไมโครลิตร

1.16 กำจัดอาร์เอ็นเอออก โดยเติม RNase A (10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) 2 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นานข้ามคืน

1.17 สกัดเอ็นไซม์ RNase A และโปรตีนออก โดยเติมฟีนอล: คลอโรฟอร์ม: ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (25: 24:1) ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ผสมโดยกลับหลอดไปมา

1.18 ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาที

1.19 คูณสารละลายใสส่วนบนใส่หลอดใหม่ แล้วเติมคลอโรฟอร์ม: ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (24:1) ลงไป 1 เท่าของปริมาตรสารละลายที่ดูมา ผสมโดยกลับหลอดไปมา

1.20 ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาที

1.21 คูณสารละลายใสส่วนบนใส่หลอดใหม่ แล้วเติมโซเดียมอะซิเตท เข้มข้น 3 โมลาร์ pH 5.2 ลงไป 0.1 เท่า และเติม absolute ethanol ลงไป 2 เท่าของปริมาตรสารละลายที่ดูมา เพื่อตกตะกอนดีเอ็นเอ เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที

1.22 ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 15 นาที

1.23 ล้างตะกอนด้วยเอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 500 ไมโครลิตร

1.24 ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 นาที

1.25 เทสารละลายทิ้ง ปล่อยให้ตะกอนดีเอ็นเอแห้ง แล้วละลายตะกอนด้วย TE buffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA) ปริมาตร 300 ไมโครลิตร เก็บสารละลายดีเอ็นเอไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

2. การพัฒนาเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์

2.1 การตัดดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

2.1.1 นำจีโนมิกดีเอ็นเอของกล้วยไม้สกุลแวนด้า พันธุ์ Robert's Delight มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *MseI* โดยใช้สารละลายดีเอ็นเอ (200 ng/μl) 5.0 ไมโครลิตร 10X Reaction Buffer 5.0 ไมโครลิตร *MseI* (10,000 U/ml) 1 ไมโครลิตร BSA (10 mg/ml) 0.5 ไมโครลิตร และเติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตรรวม 50 ไมโครลิตร

2.1.2 นำมาบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12-18 ชั่วโมง แล้วตรวจสอบผลการตัดของเอนไซม์ โดยการทำอิเล็กโทรโฟรีซิสในเจลอะกาโรสเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ และนำไปส่องดูด้วยแสงอัลตราไวโอเล็ต

2.2 การเชื่อมต่อดีเอ็นเอเข้ากับ adaptor

2.2.1 นำสารละลายดีเอ็นเอที่ถูกตัดโดยสมบูรณ์ มาเชื่อมต่อเข้ากับ *MseI* adaptor โดยใช้สารละลายดีเอ็นเอ 45.0 ไมโครลิตร *MseI* adaptor (12.5 pmol/μl) 8.0 ไมโครลิตร 10X T4 ligase buffer 10 ไมโครลิตร T4 DNA ligase (1 U/μl) 4 ไมโครลิตร และเติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตรรวม 100 ไมโครลิตร

2.2.2 นำมาบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และบ่มต่อที่อุณหภูมิห้องอีก 2 ชั่วโมง โดยลำดับเบสของ *MseI* adaptor คือ

5' GACGATGAGTCCTGAG 3'

3' TACTCAGGACTCAT 5'

2.3 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยวิธีพีซีอาร์

2.3.1 นำดีเอ็นเอที่เชื่อมต่อกับ adaptor แล้ว มาเพิ่มปริมาณด้วยวิธีพีซีอาร์ โดยใช้สารละลายดีเอ็นเอ 10.0 ไมโครลิตร ไพรเมอร์ M1 (5' GACGATGAGTCCTGAG 3') (5 pmol/μl) 4.0 ไมโครลิตร dNTP (2 mM) 6.0 ไมโครลิตร 10X PCR buffer 6.0 ไมโครลิตร *Taq* DNA polymerase (5 U/μl) 0.4 ไมโครลิตร และเติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตรรวม 60 ไมโครลิตร

2.3.2 นำเข้าเครื่องพีซีอาร์ โดยใช้อุณหภูมิและเวลาในการทำปฏิกิริยา ดังนี้

ขั้นที่ 1	denaturation	94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที
ขั้นที่ 2	denaturation	94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที
	annealing	45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที
	extension	72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที
	ทำซ้ำจำนวน 30 รอบ	
ขั้นที่ 3	extension	72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที

2.3.3 ตรวจสอบผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้ โดยการทำอิเล็กโทรโฟรีซิสในเจลอะกาโรส เข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ และนำไปส่องดูด้วยแสงอัลตราไวโอเล็ต

2.4 การแยกลำดับเบสที่เป็นไมโครแซทเทลไลต์ โดยนำผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้มาทำไฮบริดเซชันกับโอลิโกนิวคลีโอไทด์ ที่ติดฉลากด้วยไบโอติน (Biotinylated oligo) ทางด้านปลาย 5' โดยแบ่งเป็น 2 กลุ่ม กลุ่มแรก เป็น dinucleotide repeat จำนวน 2 ชนิด คือ (CA)₁₅ และ (GA)₁₅ และกลุ่มที่สอง เป็น trinucleotide repeat 2 ชนิด คือ (CCT)₁₀ และ (ACC)₁₀

2.4.1 นำสารละลายดีเอ็นเอที่ได้จากการทำพีซีอาร์มาเติมสารที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาไฮบริไดเซชันกับโอลิโกนิวคลีโอไทด์โพรบชนิดต่างๆ โดยเติมสารละลายดีเอ็นเอจากข้อ 2.3 ปริมาตร 56.0 ไมโครลิตร Biotinylated oligo (5 pmol/ μ l) ซึ่งประกอบด้วย B-(CA)₁₅ และ B-(GA)₁₅ สำหรับ dinucleotide repeat หรือ B-(CCT)₁₀ และ B-(ACC)₁₀ สำหรับ trinucleotide repeat อย่างละ 2.0 ไมโครลิตร และ Hybridization buffer (6X SSC, 0.1% SDS) 40.0 ไมโครลิตร

2.4.2 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10-15 นาที เพื่อให้ดีเอ็นเอเสียสภาพ แล้วบ่มต่อที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่ใช้ในการไฮบริไดเซชัน เป็นเวลา 12-18 ชั่วโมง

2.5 การเตรียม magnetic beads (DynaL Biotech, Norway)

2.5.1 คุด magnetic beads ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดเซนตริฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร

2.5.2 เติม Binding and Washing buffer (10 mM Tris-HCl pH 7.5, 1 mM EDTA, 1M NaCl) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน

2.5.3 วางหลอดลงในแท่นแม่เหล็ก ตั้งทิ้งไว้ 1 นาที แล้วจึงดูดสารละลายออก (ระวังอย่าคุด magnetic beads ติดออกไป)

2.5.4 ทำเช่นเดียวกับข้อ 2.5.2-2.5.3 อีก 3-4 ครั้ง

2.5.5 หลังจากดูดสารละลายออกหมดแล้ว จึงเติม Hybridization buffer ลงไป 150 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน

2.6 การทำปฏิกิริยาระหว่างโพรบกับ magnetic beads โดยเติมสารละลายดีเอ็นเอจากข้อ 2.4.2 ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงในสารละลาย beads จากข้อ 2.5.5 ผสมให้เข้ากัน แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 43 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-4 ชั่วโมง (ผสมให้เข้ากันทุก 30 นาที)

2.7 การชะดีเอ็นเอออกจาก beads

2.7.1 นำหลอดจากข้อ 2.6 วางลงในแท่นแม่เหล็ก ตั้งทิ้งไว้ 1 นาที แล้วจึงดูดสารละลายออก

2.7.2 เติมสารละลาย 2XSSC, 0.1% SDS ปริมาตร 200 ไมโครลิตร แล้วบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาที

2.7.3 วางหลอดลงในแท่นแม่เหล็ก ตั้งทิ้งไว้ 1 นาที แล้วจึงดูดสารละลายออก

2.7.4 ทำเช่นเดียวกับข้อ 2.7.2 และ 2.7.3 ซ้ำอีกครั้ง

2.7.5 เติมสารละลาย 1X SSC, 0.1% SDS ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ปริมาตร 200 ไมโครลิตร แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที

2.7.6 วางหลอดลงในแท่นแม่เหล็ก ตั้งทิ้งไว้ 1 นาที แล้วจึงดูดสารละลายออก

2.7.7 ทำเช่นเดียวกับข้อ 2.7.5 และ 2.7.6 ซ้ำอีกครั้ง

2.7.8 เติมสารละลาย 1X SSC, 0.1% SDS ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ปริมาตร 200 ไมโครลิตร แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที

2.7.9 วางหลอดลงในแท่นแม่เหล็ก ตั้งทิ้งไว้ 1 นาที แล้วจึงดูดสารละลายออก

2.7.10 ทำเช่นเดียวกับข้อ 2.7.8 และ 2.7.9 ซ้ำอีกครั้ง

2.7.11 ล้างดีเอ็นเอที่ต้องการออกจาก magnetic beads โดยเติม TE ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส ปริมาตร 60 ไมโครลิตรลงไป แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

2.7.12 วางหลอดลงในแท่นแม่เหล็ก ตั้งทิ้งไว้ 1 นาที แล้วจึงดูดสารละลายดีเอ็นเอที่ต้องการ ใส่ลงในหลอดใหม่อย่างรวดเร็ว

2.8 การทำให้ดีเอ็นเอเป็นสายคู่ และเพิ่มปริมาณด้วยวิธีพีซีอาร์

2.8.1 เติมสารละลายดีเอ็นเอจากข้อ 2.7.12 ปริมาตร 2.0 ไมโครลิตร ไพรเมอร์ M1 (5 pmol/ μ l) 2.0 ไมโครลิตร dNTP (2 mM) 2 ไมโครลิตร 10X PCR buffer 2.0 ไมโครลิตร *Taq* DNA polymerase (5 U/ μ l) 0.1 ไมโครลิตร แล้วเติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตรรวม 20 ไมโครลิตร

2.8.2 นำเข้าเครื่องพีซีอาร์ โดยใช้อุณหภูมิและเวลาในการทำปฏิกิริยา เช่นเดียวกับข้อ 2.3.2

2.8.3 ตรวจสอบผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้ โดยการทำอิเล็กโทรโฟรีซิสในเจลอะกาโรส เข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ และนำไปส่องดูด้วยแสงอัลตราไวโอเล็ต

2.8.4 นำผลผลิตพีซีอาร์มาทำให้บริสุทธิ์ โดยใช้ชุดน้ำยาสำเร็จรูป (QIAGEN, USA) และตรวจสอบผล เช่นเดียวกับข้อ 2.8.3

2.9 การเชื่อมต่อดีเอ็นเอเข้ากับพลาสมิด

2.9.1 ทำการเชื่อมต่อชิ้นส่วนดีเอ็นเอเข้ากับพลาสมิด pGEM[®]-T Vector (Promega, USA) โดยใส่สารละลายดีเอ็นเอจากข้อ 2.8.4 ปริมาตร 3.0 ไมโครลิตร 2X Ligation buffer 5.0 ไมโครลิตร พลาสมิด pGEM[®]-T Vector 1.0 ไมโครลิตร T4 DNA ligase (400,000 U/ μ l) 1.0 ไมโครลิตร

2.9.2 นำมาบ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12-18 ชั่วโมง

2.10 การถ่ายพลาสมิดสายผสมเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย

2.10.1 เดิมสารละลายดีเอ็นเอที่เชื่อมต่อกับพลาสมิดปริมาตร 5 ไมโครลิตร ลงในหลอดที่มีคอมพิเทนส์เซลล์ (Promega, USA) 100 ไมโครลิตร แช่ในน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที

2.10.2 ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิอย่างรวดเร็ว (heat shock) โดยจุ่มลงในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที แล้วย้ายมาแช่ในน้ำแข็งทันที เป็นเวลา 2 นาที

2.10.3 เดิมอาหารเลี้ยงแบคทีเรีย SOC (2% tryptone, 0.5% yeast extract, 10 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄, 20 mM glucose pH 6.8-7) ปริมาตร 900 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง โดยเขย่าที่ความเร็ว 250 รอบต่อนาที

2.10.4 ดูดสารละลายจากข้อ 2.10.3 ปริมาตร 150 ไมโครลิตร มาเกลี่ย (spread) ให้ทั่วผิวหน้าอาหาร LB agar ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร X-gal 40 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ IPTG 40 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ผสมอยู่ด้วย

2.10.5 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง จากนั้นคัดเลือกโคโลนีสีขาวมาทำการทดลองต่อไป

3. การคัดเลือกและตรวจสอบโคลนที่มีลำดับไมโครแซทเทลไลต์

3.1 การเตรียมแผ่นเมมเบรน

3.1.1 ตัดแผ่นไนลอนเมมเบรน ขนาด 8 x 12 ตารางเซนติเมตร

3.1.2 ตัดกระดาษกรองให้มีขนาดใหญ่กว่าแผ่นไนลอนเมมเบรนเล็กน้อย

3.1.3 จุ่มในลอนเมมเบรนลงในน้ำกลั่นให้เปียกทั่วทั้งแผ่น แล้วจุ่มลงในสารละลาย 20X SSC

3.1.4 วางแผ่นในลอนเมมเบรนลงบนกระดาษกรอง เพื่อซับน้ำออกพอดำๆ จากนั้นจึงวางแผ่นในลอนเมมเบรนลงบนพลาสติกใส ที่มีตำแหน่งของจุดที่จะทำการหยดดีเอ็นเอ

3.1.5 นำผลผลิตพีซีอาร์มาให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที เพื่อให้ดีเอ็นเอเสียสภาพเป็นสายเดี่ยว แล้วย้ายหลอดใส่ในน้ำแข็งทันที เพื่อป้องกันการกลับมาจับกันของดีเอ็นเอเป็นสายคู่อีก

3.1.6 ดูดผลผลิตพีซีอาร์จากข้อ 3.1.5 ปริมาตร 0.5 ไมโครลิตร หยดลงบนแผ่นในลอนเมมเบรนที่เตรียมไว้แล้ว

3.1.7 ตรึงดีเอ็นเอให้ติดกับแผ่นในลอนเมมเบรน โดยใช้แสงอัลตราไวโอเล็ต เป็นเวลา 10 นาที

3.1.8 นำมาทำไฮบริไดเซชันที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส โดยใช้ Biotinylated oligo เป็นโพรบ และตรวจสอบผลโดยใช้ชุดตรวจสอบ North2South Chemiluminescent Hybridization and Detection Kit (Pierce Biotechnology, USA)

4. การทำอิเล็กโทรโฟรีซิสบนโพลีอะครีลาไมด์เจล

4.1 การเตรียมกระจกสำหรับเทเจล

4.1.1 ล้างกระจกให้สะอาด แล้วเช็ดด้วยเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์

4.1.2 เช็ดกระจกแผ่นหลังด้วย bind silane (bind silane 1 ไมโครลิตร glacial acetic acid 2.5 ไมโครลิตร และเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ 500 ไมโครลิตร) เพื่อให้เจลเกาะติดกับกระจก

4.1.3 เช็ดกระจกแผ่นหน้าด้วย repel silane เพื่อไม่ให้เจลเกาะติดกระจก

4.1.4 ประกบกระจกทั้ง 2 แผ่นเข้าด้วยกัน โดยวาง spacer ไว้ทั้ง 2 ข้าง เพื่อให้เกิดช่องว่างระหว่างกระจก ใช้เทปกาวติดขอบกระจกทั้ง 3 ด้านเพื่อไม่ให้เจลรั่วซึมออกมา จากนั้นยึดด้วยคลิปหนีบ

4.2 การเตรียมโพลีอะครีลาไมด์เจล

4.2.1 ชั่งยูเรีย 6.75 กรัม เติมน้ำกลั่น 3.75 มิลลิลิตร และ 5X TBE 3 มิลลิลิตร อุ่นที่อุณหภูมิประมาณ 50 องศาเซลเซียส จนยูเรียละลายหมด รอจนอุณหภูมิลดลงประมาณอุณหภูมิห้อง

4.2.2 เติมอะครีลาไมด์เจล (acrylamide:bisacrylamide = 19:1) ความเข้มข้น 30 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ammonium persulfate ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 150 ไมโครลิตร และ TEMED ปริมาตร 8 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน ระวังอย่าให้เกิดฟอง

4.2.3 เทเจลใส่ลงในช่องระหว่างกระจกจนเต็ม ใส่หัวลิ้งไป วางกระจกในแนวระดับ แล้วปล่อยให้เจลแข็งตัวประมาณ 2-3 ชั่วโมง

4.3 การทำอิเล็กโทรโฟรีซิส

4.3.1 เมื่อเจลแข็งตัวดีแล้ว ล้างกระจกด้านนอกให้สะอาด แกะเทปกาว ดึงหัวออก และประกอบกระจกเข้ากับชุดอิเล็กโทรโฟรีซิส เติม 1X TBE ลงในช่องทั้งด้านบนและด้านล่าง

4.3.2 ต่อเครื่องเข้ากับกระแสไฟฟ้า ความต่างศักย์ 300 โวลต์ เป็นเวลาอย่างน้อย 30 นาที

4.3.3 ปิดเครื่อง แล้วใช้เข็มฉีดยาคูดับฟเฟอร์ล้างยูเรียที่อยู่ในช่องหัวแต่ละช่องให้หมด

4.3.4 หยอดตัวอย่างดีเอ็นเอ 3-6 ไมโครลิตร ที่ผสมกับ loading buffer (98% formamide , 10 mM EDTA, 0.1% bromphenol blue และ 0.1% xylene cyanol) ในอัตราส่วน 1 ต่อ 1 ลงในหัวแต่ละช่อง

4.3.5 เปิดเครื่องโดยใช้ความต่างศักย์เท่าเดิม เป็นเวลา 3-5 ชั่วโมง ขึ้นอยู่กับขนาดของผลผลิตพีซีอาร์

4.3.6 ปิดเครื่อง แล้วนำกระจกออกมา แยกกระจกทั้ง 2 แผ่นออกจากกัน แล้วนำเจลไปย้อมด้วยซิลเวอร์ไนเตรท

4.4 การย้อมเจลด้วยซิลเวอร์ไนเตรท

4.4.1 นำแผ่นกระจกด้านที่มีเจลดิจอยู่มาล้างในน้ำกลั่น โดยเขย่านาน 3-5 นาที

4.4.2 แช่แผ่นเจลในสารละลาย CTAB ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ เขย่านาน 30 นาที

4.4.3 นำแผ่นเจลใส่ในสารละลายแอมโมเนีย ความเข้มข้น 0.3 เปอร์เซ็นต์ เขย่านาน 15 นาที

4.4.4 ย้ายแผ่นเจลมาย้อมในสารละลายซิลเวอร์ไนเตรทที่เตรียมใหม่ๆ เขย่าเป็นเวลา 20 นาที

4.4.5 จุ่มแผ่นเจลในน้ำกลั่นอย่างรวดเร็ว แล้วแช่ในสารละลาย developer (2% sodium carbonate, 0.02% formaldehyde) ที่มีอุณหภูมิประมาณ 10 องศาเซลเซียส เขย่าเบาๆ จนเห็นแถบดีเอ็นเอชัดเจน

4.4.6 นำแผ่นเจลมาจุ่มน้ำกลั่นอย่างรวดเร็ว แล้วหยุดปฏิกิริยาโดยแช่ในสารละลายกลีเซอรอล ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ นาน 30 นาที แล้วผึ่งให้แห้ง

ประวัติการศึกษา และการทำงาน

ชื่อ –นามสกุล	นางสาวปรารณา เพือกวิไล
วัน เดือน ปี ที่เกิด	5 กุมภาพันธ์ 2525
สถานที่เกิด	กรุงเทพมหานคร
ประวัติการศึกษา	วท.บ. (ชีววิทยา) สาขาพันธุศาสตร์ (เกียรตินิยมอันดับ1) มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ (พ.ศ. 2546)
ตำแหน่งหน้าที่การงานปัจจุบัน	-
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	-
ผลงานทางวิชาการ	นำเสนอผลงานในการประชุมวิชาการพันธุศาสตร์ แห่งชาติ ครั้งที่ 15
ทุนการศึกษาที่ได้รับ	ได้รับทุนผู้ช่วยสอนจากบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ (พ.ศ. 2548)